

**Untersuchungen zur Induktion der Anilin-p-hydroxylase
in der Leber der Maus:
Wirkung von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung,
2, 4, 6-Triäthylenimino-s-triazin und
Hemmstoffen der Proteinsynthese**

Michael Erber

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
unter Anleitung von Prof. Dr. K. Tempel

Untersuchungen zur Induktion der Anilin-p-hydroxylase
in der Leber der Maus:
Wirkung von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung,
2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin und Hemmstoffen der Proteinsynthese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michael Erber
aus Stade

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München



Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. D. Hegner

Tag der Promotion: 21. Februar 1975

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	PROBLEMSTELLUNG	1
2.	EINLEITUNG anhand neuerer Literatur	2
2.1.	Zum Metabolismus von Fremdstoffen	2
2.1.1.	Allgemeines	2
2.1.2.	Das Fremdstoff-hydroxylierende Enzymsystem	4
2.1.2.1.	Geschichtliches	4
2.1.2.2.	Lokalisation	5
2.1.2.3.	Bestandteile und Funktion	5
2.1.2.4.	Nomenklatur der Hydroxylasen	7
2.2.	Die Induktion des Fremdstoff-hydroxylierenden Enzymsystems in der Leber	8
2.2.1.	Definition der Begriffes "Induktion"	8
2.2.2.	Geschichtliches	8
2.2.3.	Induktionsverlauf	15
2.2.3.1.	Induktor	15
2.2.3.2.	Enzymmuster	15
2.2.3.3.	Wirkungsmechanismus	17
2.2.4.	Vermehrung des glatten Endoplasmatischen Retikulums	18
2.2.5.	Zusammenfassung der Eigenschaften der Induktoren	20
2.3.	Faktoren mit Einfluß auf die Enzymaktivitäten und ihre Induktion	22
2.3.1.	Art des Induktors	22
2.3.2.	Species und Stamm	22
2.3.3.	Geschlecht	24
2.3.4.	Trächtigkeit	25
2.3.5.	Alter	26
2.3.6.	Ernährung	26
2.3.7.	Käfighygiene	27
2.3.8.	Einstreu	28
2.3.9.	Weitere Faktoren	28

	Seite
3. MATERIAL und METHODIK	29
3.1. Reagentien und Tiermaterial	29
3.1.1. Reagentien	29
3.1.2. Versuchstiere	31
3.1.3. Haltung und Fütterung der Tiere	31
3.1.4. Behandlung der Tiere	31
3.1.4.1. Bestrahlung	31
3.1.4.2. Applikation von Phenobarbital, Hemmstoffen der Proteinsynthese und 2,4,6-Triäthylenimino-s- triazin	32
3.1.5. Aufarbeitung der Tiere	32
3.1.6. Verarbeitung der Lebern	32
3.2. Bestimmung der Aktivität der Anilin-p-hydroxylase	33
3.2.1. Prinzip	33
3.2.2. Lösungen	34
3.2.3. Ausführung	34
3.2.4. Meßgrößen	35
3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration des "mikrosomalen" Überstandes	35
3.3.1. Prinzip	35
3.3.2. Lösungen	36
3.3.3. Ausführung	37
3.3.4. Berechnung der Proteinkonzentration	37
3.4. Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehaltes	37
3.4.1. Prinzip	37
3.4.2. Lösungen und Reagentien	37
3.4.3. Ausführung	38
3.4.4. Berechnung des Cytochrom P-450-Gehaltes	38
3.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse	38
4. ERGEBNISSE	40
4.1. Reaktionsbedingungen für die p-Hydroxylierung von Anilin	40
4.1.1. Enzymkonzentration	40

III

	Seite
4.1.2. Präparation des "mikrosomalen" Überstandes	41
4.1.3. pH-Optimum	42
4.1.4. Kofaktoren	42
4.1.5. Substratkonzentration	44
4.1.6. Haltbarkeit des "mikrosomalen" Überstandes	44
4.1.7. Haltbarkeit des Reaktionsmediums	44
4.1.8. Inkubationszeit	45
4.2. Die Indophenol-Farbreaktion	47
4.2.1. Tiefkühlung des Ätherextraktes	47
4.2.2. Verlauf der Indophenol-Farbreaktion	47
4.3. Wirkung von Phenobarbital auf die Leber der Maus	48
4.3.1. Relatives Organgewicht	48
4.3.2. Proteinkonzentration des "mikrosomalen" Überstandes	48
4.3.3. Aktivität der Anilin-p-hydroxylase	48
4.3.3.1. Zeitabhängigkeit	48
4.3.3.2. Dosisabhängigkeit	53
4.3.3.3. Enzymkinetik	54
4.4. Einfluß verschiedener Faktoren auf die AH und ihre Induktion	55
4.4.1. Geschlecht	55
4.4.2. Tageszeit	55
4.4.3. Haltungsbedingungen	56
4.5. Kontrollwerte	58
4.6. Einfluß von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung auf die AH und ihre Induktion	60
4.6.1. Dosisabhängigkeit	60
4.6.2. Bestrahlungszeitpunkt	60
4.6.3. Wiederholte GKB	62
4.7. Einfluß von 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin auf die AH und ihre Induktion	63
4.7.1. Dosisabhängigkeit	63
4.7.2. Applikationszeitpunkt	65
4.7.3. Wiederholte Gabe kleiner Dosen	66
4.8. Einfluß von Hemmstoffen der Proteinsynthese auf die AH und ihre Induktion	67

IV

	Seite
4.8.1. Aethionin	67
4.8.2. Cycloheximid	69
4.8.2.1. Anilin-p-hydroxylase-Aktivität	69
4.8.2.2. Cytochrom P-450-Gehalt	71
4.8.3. Actinomycin D	72
4.8.3.1. Dosisabhängigkeit	72
4.8.3.2. Wiederholte Gabe kleiner Dosen	73
4.8.3.3. Ohne Induktion	73
4.8.3.4. 48 Std nach PB-Gabe	74
4.8.3.5. Beeinflussung der AH-Kinetik	75
4.8.4. Kombinationswirkungen	77
4.8.5. Wirkung von Hemmstoffen auf den Verlauf der Induktion	78
5. DISKUSSION	79
5.1. Zu den Vorversuchen	79
5.1.1. Reaktionsbedingungen der AH in vitro	79
5.1.2. Beeinflussung der AH in vivo	79
5.2. Zur Beeinflussung der durch PB induzierten Aktivität der AH in der Leber der Maus	81
5.2.1. Aethionin	81
5.2.1.1. Wirkungsmechanismus	81
5.2.1.2. Befunde	82
5.2.2. Cycloheximid	82
5.2.2.1. Wirkungsmechanismus	82
5.2.2.2. Befunde	84
5.2.3. Actinomycin D	85
5.2.3.1. Wirkungsmechanismus	85
5.2.3.2. Befunde	89
5.2.4. Röntgenstrahlen	92
5.2.4.1. Wirkungsmechanismus	92
5.2.4.2. Befunde	93
5.2.5. 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin	95
5.2.5.1. Wirkungsmechanismus	95
5.2.5.2. Befunde	97

1. PROBLEMSTELLUNG

Den bisherigen Untersuchungen zufolge ist die Biosynthese von Protein in der Leber des Säugers sowohl gegenüber ionisierenden Strahlen als auch gegenüber radiomimetisch wirksamen Verbindungen vom Typ der "Biologischen Alkylantien" verhältnismäßig unempfindlich. Unter den gleichen Bedingungen wird dagegen die Induktion verschiedener Enzyme gehemmt, zu denen u. a. solche des Nucleinsäure-Stoffwechsels gehören. Genspezifische Schäden oder Veränderungen auf der Ebene der Translation werden als Ursachen für die unterschiedliche Beeinflußbarkeit von Induktionsvorgängen durch ionisierende Strahlen oder biol. Alkylantien verantwortlich gemacht.

Als experimenteller Beitrag zum skizzierten Problemkreis wurde vorliegend das Verhalten einer durch Barbituratvorbehandlung induzierten gemischtfunktionellen Oxidase, der Anilin-p-hydroxylase, in der Leber der Maus unter dem Einfluß von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB) und 2, 4, 6-Triäthylenimino-s-triazin (TEM) untersucht. Zum Vergleich wurden spezifische Hemmstoffe der Proteinsynthese (Actinomycin D, Cycloheximid und Aethionin) in die Untersuchungen einbezogen.

2. EINLEITUNG anhand neuerer Literatur

2.1. Zum Metabolismus von Fremdstoffen

2.1.1. Allgemeines

Fremdstoffe sind körperfremde, chemische Substanzen, die mit biochemischen Reaktionen der lebenden Zellen mehr oder weniger stark interferieren (297). Sie gelangen in den Körper u. a. als Rauchpartikel, Gase, Farbstoffe, Konservierungs-, Desinfektions- und Arzneimittel. Da die meisten Fremdstoffe schlecht wasserlöslich sind, werden sie in unveränderter Form durch die Nieren nur sehr langsam ausgeschieden. Täglich aufgenommen würden sie daher im Organismus akkumulieren und toxische Konzentrationen erreichen, wenn die Leber nicht die Fähigkeit hätte, diese Substanzen in wasserlöslichere Verbindungen umzuwandeln (Abb. I). Diese sind in der Regel weniger toxisch.

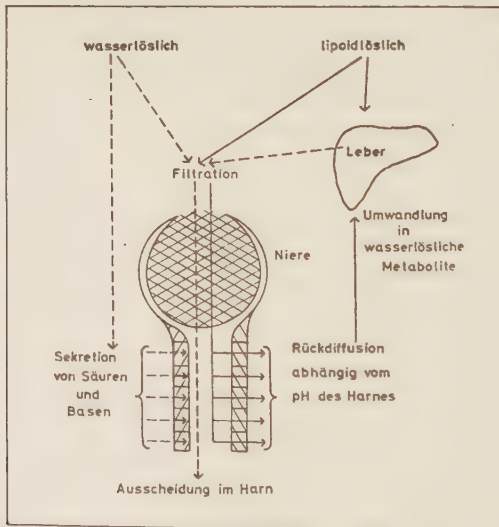


Abb. I: Ausscheidung von Fremdstoffen (nach REMMER 297).

Das Enzymsystem für den Fremdstoffmetabolismus ist fast ausschließlich in den Membranen des glatten Endoplasmatischen Retikulums (E.R.) lokalisiert (90, 132, 293, 297, 298, 301, 302, 303). Diese Membranen werden bei ihrer Präparation zerstört und die dabei entstehenden Partikel werden als Mikrosomen bezeichnet.

Der Metabolismus von Fremdstoffen läuft in der Regel über zwei Phasen ab. Die erste Phase ist durch Reaktionen wie Oxidation, Reduktion und Hydrolyse charakterisiert, während in der zweiten Phase die Produkte der ersten Phase, welche jetzt geeignete reagible Gruppen wie OH, COOH und NH_2 haben, eine synthetische Reaktion eingehen. Sie wird meist als Konjugation bezeichnet und führt häufig zu relativ starken organischen Säuren. Die Reaktionen beider Phasen ergeben in der Regel Verbindungen mit höherer Polarität, welche somit bei physiologischem pH-Wert besser wasserlöslich und durch die Niere leichter ausscheidbar sind (Tab. A).

Tab. A: Metabolismus von Fremdstoffen

Fremdstoff	Phase I	Oxidations-, Reduktions-, Hydrolyse- Produkte	Phase II	Konjugations- oder Synthese- Produkte
Als Beispiel sei der Hauptstoffwechselweg von Benzol dargestellt:				
Benzol C_6H_6	Phase I Oxidation	Phenol $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ pKa 10	Phase II Konjugation	Phenylglucuronid $\text{C}_6\text{H}_5\text{O} \times \text{C}_6\text{H}_9\text{O}_6$ pKa 3, 4
Ionisierung bei pH 7, 4:		0, 25 %		99, 99 %

In Tab. B sind die möglichen biologischen Konsequenzen des Metabolismus von Fremdstoffen schematisch dargestellt.

Tab. B: Biologische Konsequenzen des Metabolismus von Fremdstoffen (nach WILLIAMS, 396)

Phase I-Reaktionen (Oxidation, Reduktion, Hydrolyse)

- a. Inaktive Verbindung wird zu aktivem Produkt
- b. Aktive Verbindung wird zu inaktivem Produkt
(bzw. weniger aktivem Produkt)
- c. Aktive Verbindung wird zu Verbindung mit anderer Aktivität

Phase II-Reaktionen (Synthesen)

- d. Entgiftung (i.e. Konjugation)
- e. "Letalsynthese" (i.e. Bildung von Antimetaboliten, die wichtige Metabolismuswege blockieren)

Einige enzymatische Fremdstoffumwandlungen finden im Zytosol der Leberzellen statt. Nur zwei dieser Reaktionen sind für den Fremdstoffmetabolismus von größerer Bedeutung und sollen hier erwähnt werden, nämlich die Azetylierung von Arzneimitteln wie Sulfonamiden und Isoniazid und die Oxidation von Alkohol durch die Alkohol-dehydrogenase (396).

Die biologisch wichtigste Phase I-Reaktion beim Metabolismus von Fremdstoffen ist die Hydroxylierung der meisten lipidlöslichen Verbindungen zu mehr polaren und wasserlöslichen Substanzen.

2.1.2. Das Fremdstoff-hydroxylierende Enzymsystem

2.1.2.1. Geschichtliches

In den frühen 50er Jahren entdeckten BRODIE und AXELROD ein Enzymsystem in der Leber, das Arzneimittel hydroxyliert und eine sehr wichtige Rolle bei deren Abbau und Ausscheidung spielt (13, 14, 40, 223).

Die Natur dieses Enzymsystems blieb unklar bis 1963 ESTABROOK, COOPER, ROSENTHAL und andere in den Mikrosomen der Nebennierenrinde ein besonderes Cytochrom entdeckten, genannt Cytochrom P-450, das Progesteron am C₂₁ hydroxyliert (89, 263). Weitere Studien ergaben, daß das gleiche Cytochrom, das einige Jahre vorher in Leberzellen gefunden wurde (KLINGENBERG, 205), auch für die Hydroxylierung von Fremdstoffen verantwortlich ist (303, 87).

2.1.2.2. Lokalisation

Cytochrom P-450 (Cyt P-450) ist wie fast alle fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in den glatten Membranen des E.R. lokalisiert (82, 89, 90, 118, 132, 263, 293, 297, 298, 301, 302, 303). Das Organ mit dem höchsten Gehalt an Cyt P-450 ist die Leber. Weit geringere Mengen findet man in Niere > Lunge > Darmschleimhaut > Äußere Haut (375). Bezogen auf g Frischgewicht enthält die Niere 1/7 der in der Leber vorhandenen Menge. Wenn man dazu das sechsmal höhere Gewicht der Leber berücksichtigt, so finden in der Niere nur 2,5 % der gesamten Fremdstoffhydroxylierung des Organismus statt. Die anderen erwähnten Gewebe tragen noch weit weniger dazu bei (122, 164).

2.1.2.3. Bestandteile und Funktion

Das hydroxylierende Enzymsystem, im angloamerikanischen Sprachraum häufig als "mixed function oxidase system" bezeichnet, enthält mdst. drei Komponenten, nämlich NADPH als Wasserstoff- bzw. Elektronendonator, ein NADPH-oxidierendes Flavoprotein, genannt Cytochrom c-reductase und ein CO-bindendes Pigment, das Cyt P-450, welches als terminale Oxidase dient (91).

Alle lipidlöslichen Verbindungen, endogene ebenso wie exogene, werden an Cyt P-450 gebunden und (soweit es ihre chemische Struktur erlaubt) hydroxyliert (91, 119, 245). Die Bindung an Cyt P-450 erzeugt eine Konformationsänderung im Molekül, die spektrophotometrisch

erfaßt werden kann. Oxidiertes Cyt P-450 hat ein Absorptionsmaximum (= Peak) bei 420 nm. Je nach Art der gebundenen Substrate treten weitere Absorptionsbanden auf. Substrate, die einen Peak bei etwa 390 nm verursachen, werden Typ I-Verbindungen genannt (z. B. Hexobarbital). Als Typ II-Verbindungen gelten solche mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 430 nm (z. B. Anilin) (91, 202, 300, 304, 322).

Die Bindung von Fremdstoffen an Cyt P-450 scheint mit dem klassischen Pharmakon-Rezeptor-Modell vergleichbar, wenn nicht identisch zu sein.

Für den Elektronentransport in den Mikrosomen wurde folgendes Schema aufgestellt (Abb. II):

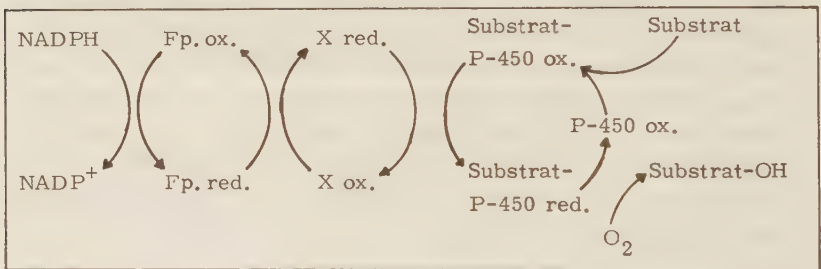


Abb. II: Elektronentransport in den Mikrosomen (nach HOLTZMAN 162).

Abkürzungen: Fp. = Flavoprotein (in der Leber: Cytochrom-c-reductase, die eng verwandt oder sogar identisch mit der Cytochrom P-450-reductase ist; in der Nebenniere: Adrenodoxin-reductase), ox. = oxidierte Form und red. = reduzierte Form, X = Carrier zwischen Cytochrom-c-reductase und dem Cyt P-450-System (ist bei Lebermikrosomen möglicherweise unnötig, scheint aber im mitochondrialen P-450-System der Nebennierenrinde, für das obiges Schema entwickelt wurde, ein Nicht-Häm-Eisenprotein zu sein).

Das Substrat wird sowohl an die oxidierte wie an die reduzierte Form des Cyt P-450 relativ fest gebunden (266). Der Komplex von Substrat und reduziertem Cyt P-450 reagiert mit Sauerstoff zu oxidiertem Substrat und der oxidierten Form des Cyt P-450. Cyt P-450-abhängige Oxidationen sind durch Kohlenmonoxid hemmbar, das sich leicht an

reduziertes Cyt P-450 bindet und dadurch die Bindung mit dem Substrat verhindert.

Die Stöchiometrie dieser Reaktion kann folgendermaßen ausgedrückt werden, wobei X für den Fremdstoff steht (89, 263):



Die bei der Oxidation über Cyt P-450 in der Leberzelle anfallende Energie kann der Zelle nicht wie in den Mitochondrien zur Verfügung gestellt werden, sondern geht verloren (91).

Im intermediären Stoffwechsel reichen die Umsatzzahlen (Anzahl der umgewandelten Substratmoleküle / mol Enzym / min) von 1000 bis zu einigen Millionen, während die Zahl der durch Cyt P-450 von Rattenleber umgewandelten Moleküle zwischen 0,2 und 15 schwankt (294 b). Trotz dieser ungewöhnlich niedrigen Umsatzzahl werden die meisten Fremdstoffe mit einer befriedigenden Geschwindigkeit hydroxyliert, da eine erstaunlich große Menge des hydroxylierenden Systems vorhanden ist. Die Leber von Ratten und Kaninchen enthält 30 bis 40 nmol Cyt P-450 pro g Frischgewicht (135). Da das Molekulargewicht dieses Enzyms 50000 bis 60000 beträgt (72), entfällt mehr als 1 % des gesamten Leberproteins auf Cyt P-450. Das übertrifft bei weitem den Anteil aller anderen Cytochrome in der Leber.

2.1.2.4. Nomenklatur der Hydroxylasen

Da die Cyt P-450-Menge und der Substratumsatz durch verschiedene Behandlungen z. T. unterschiedlich beeinflusst werden, muß am Metabolismus einer jeden Verbindung jeweils mdst. ein weiteres spezifisches Enzym beteiligt sein. Diese Hydroxylasen sind biochemisch nicht exakt bestimmt und von der internationalen Enzymnomenklaturkommission noch nicht systematisiert (102).

Für die Bildung von Trivialnamen schlug die Kommission 1964 das Schema: "Substrat-n-hydroxylase" vor, wobei "n" die Position der Hydroxylierung am Molekül bedeutet. Die in vorliegender Arbeit un-

tersuchte Enzymaktivität ist somit als "Anilin-p-hydroxylase" zu bezeichnen. Nach dem neuen System der Kommission von 1972 werden die Hydroxylasen als Oxygenasen bezeichnet, wobei die Monooxygenasen mit externem H_2 -Bedarf je nach dem H_2 -Donator in Gruppen eingeteilt werden. Die Anilin-p-hydroxylase wäre demnach eine externe Monooxygenase (E. C. 1. 14.) mit einem Pyridinnucleotid-Flavoprotein als H_2 -Donator (E. C. 1. 14. 13.) (151). Da aber die einzelnen Oxygenasen noch immer nicht eindeutig biochemisch bestimmt sind, wird auch in neuesten Arbeiten noch an Trivialnamen nach dem Schema "Substrat-n-hydroxylase" festgehalten.

2.2. Die Induktion des Fremdstoff-hydroxylierenden Enzymsystems in der Leber

2.2.1. Definition des Begriffes "Induktion"

Unter "Induktion" ist jeder Anstieg der Menge eines spez. Proteins ohne Berücksichtigung des zugrunde liegenden Mechanismus zu verstehen (134). Induktion ist gleichbedeutend mit einem Anstieg des Verhältnisses von Synthese- und Abbaurate. Häufig wird der Begriff "Stimulierung" in gleichem Sinne wie "Induktion" verwendet.

2.2.2. Geschichtliches

Schon in der Mitte des letzten Jahrhunderts beobachtete der französische Physiologe BROWN-SEQUARD die verstärkte Reaktion von adrenaletomierten Tieren auf die Behandlung mit verschiedenen Arzneimitteln (zit. von REMMER 297). REMMER konnte 1958 eine verzögerte Arzneimittel-Oxidation in der Leber von adrenaletomierten Ratten nachweisen (283, 284). Die daraus entwickelte Hypothese, daß die Erhöhung der Toleranz gegenüber Barbituraten und Morphin über die Aktivierung der Hypophysen-Nebennieren-Achse bewirkt würde, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Weder ACTH noch Glucocorticoide erhöhten die Toleranz eindeutig (297).

Völlig neue Aspekte des Problems ergaben sich aus der Feststellung, daß nach Phenobarbital-Vorbehandlung die Oxidation von Hexobarbital auf ein Mehrfaches anstieg, während gleichzeitig die Hexobarbital-Schlafzeit verringert war (299). Dieses Phänomen konnte auch bei adrenal- oder hypophysektomierten Ratten ausgelöst werden (287). Die "Stresstheorie" mußte somit endgültig aufgegeben werden, da offensichtlich eine direkte Beeinflussung der Leber vorlag.

Die Wirkung von Phenobarbital (PB) auf den Arzneimittelstoffwechsel unterscheidet sich wesentlich von der sogenannten Gewöhnung, wie sie z. B. bei Morphin beobachtet wird. PB beschleunigt auch den Metabolismus von Verbindungen, zu denen es keinerlei chemische Verwandtschaft besitzt, so die oxidative Demethylierung von Pethidin oder von Monomethylaminoantipyrin (286). Ferner entwickelt sich die erhöhte Oxidationsrate nicht langsam während Tagen oder Wochen, sondern beginnt plötzlich 6 bis 12 Std nach der ersten Dosis des Barbiturats (282). Diese eigentümliche Wirkung von PB teilen fast alle Hypnotica (289, 306).

Etwa zur selben Zeit, als REMMER in Deutschland mit Barbituraten experimentierte, beobachtete CONNEY in den USA, daß das Carcinogen 3-Methylcholanthren die Demethylierung von einigen anderen Carcinogenen erhöhte (56, 57, 61). Auf diese Weise konnte er die seltsame Beobachtung erklären, daß 3-Methylcholanthren nicht wie angenommen die Wirkung anderer gleichzeitig verabreichter Carcinogene verstärkte, sondern im Gegenteil die Cancerisierung durch Azofarbstoffe hemmte (249, 308). Daraufhin testete CONNEY eine große Anzahl verschiedener Substanzen und fand ebenfalls, daß PB die wirksamste Verbindung zur Induktion des Fremdstoff-hydroxylierenden Enzymsystems ist.

Viele andere Studien fügten seitdem weitere Arzneimittel zu der wachsenden Zahl von Verbindungen, die den Fremdstoffmetabolismus induzieren (Tab. C).

Tab. C: Therapeutische Verbindungen, die den Fremdstoffmetabolismus induzieren (nach REMMER 297).

Zum Vergleich sind auch Verbindungen aufgeführt, die nicht als Therapeutica verwendet werden, wie Insektizide und Karzinogene. Die Zahl der Kreuze zeigt die Stärke der induzierenden Wirkung. Ihre Beurteilung ist jedoch sehr schwierig, da der Grad der Induktion von der Dauer des Verbleibs einer genügend hohen Konzentration in der Leber abhängt. Letztere wird von zahlreichen Faktoren bestimmt, von denen die Dosis, das Verhältnis von Wasser- zu Fettlöslichkeit, die Ausscheidungsrate der Verbindung und die verwendete Tierart genannt seien.

Die meisten Untersuchungen wurden mit Ratten oder Mäusen durchgeführt. Nur Verbindungen, hinter denen drei oder vier Kreuze angegeben sind, induzieren den Fremdstoffmetabolismus signifikant, wenn sie mdst. einige Tage in therapeutischen Dosen verabreicht werden. Verbindungen, die mit zwei Kreuzen markiert sind, induzieren nur, wenn sie in sehr hohen Dosen verabreicht werden. Kreuze in Klammern bedeuten, daß entweder während der Behandlung oder auch noch ein oder zwei Tage später der Anstieg der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme verborgen bleiben kann, da zu einem gewissen Grad alle Induktoren eine hemmende Wirkung haben, wenn sie an Cytochrom P-450 gebunden sind (62). +/- (bei Clofibrat) bedeutet: Vermehrung des E.R. und der Peroxisomen, aber nur geringe Aktivierung der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme.

Abkürzungen:

PCN	3 β -Hydroxy-20-oxo-5-pregnen-16 -carbonitril
SKF-525A	1, 1-Diphenyl-1-propyl-essigsäure-2'-diäthylamino-äthylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
o, p'-DDD	2, 2'-bis(2-chlorophenyl)-1, 1-dichloräthan
DDT	Chlorphenothan
PCB	Polychlorierte Biphenyle

Pharmakologische Gruppe	Verbindung	Induktions- wirkung	Literatur
Inhalations- narkotika	Lachgas	+	288, 296
	Äther	+	288, 296
	Chloroform	+	297
	Divinyläther	0	297
	Halothan	0	297
Hypnotika und Sedativa	Urethan	+	111, 192a, 214, 289
	Cabromal	++	214, 289
	Barbiturate	(++++)	57, 177, 179, 192a, 285, 286, 289
	Pyridion	++	214, 289
	Methylprylon	++	214, 289
	Gluthetimid	(+++)	179, 192a, 214, 289, 328
	Thalidomid	0	176, 297
	Äthanol	+	9, 289, 305, 315, 316
	Chloralhydrat	+++	67, 192a, 297
	Chlorbutanol	+	176, 192a
	Chloralose	+	289
	Äthinamat	0	214, 289
	Hydroxydion	0	192a
	N-Phenylbarbital	(+++)	67
Antikonvulsiva	Diphenylhydantoin	(+++)	12, 59, 192a, 214, 289
	Methylphenyläthyl- hydantoin	(+++)	214, 289
	Paramethadion	++	214, 289
	Trimethadion	0	214, 289
	Primidon	++	192a

Fortsetzung Tab. C:

Pharmakologische Gruppe	Verbindung	Induktions- wirkung	Literatur
Tranquillizer	Phenylglycodol	++	177, 180, 192a
	Meprobamat	++	80, 180, 273
	Chlordiazepoxid	(+++)	163
	Diazepam	(++++)	154
Antipsychotika	Chlorpromazin	++	37, 192a, 388
	Triflupromazin	++	180, 192a
	Perazin	(++)	37
	Promazin	0	388
Antidepressiva	Iproniazid	+	355
	Imipramin	+	37, 74
ZNS-Stimulantien	Nikethamid	+++	34, 179, 192a, 214, 289
	Bemegrid	++	214, 289
	Pentylentetrazol (Metrazol)	0	214, 289
	Amphetamin	0	180, 192a
Antiinflammatorische Verbindungen	Phenylbutazon	(+++)	43, 51, 57
	Aminopyrin	++	57
	Azetylsalizylsäure	0	44, 179
Analgetika	Pethidin	0	287, 289
	Morphin	0	287, 289
Muskelrelaxantien	Mephenisin	+	192a
	Carisoprodol	+	192a
	Zoxazolamin	0	57, 180
Antihistaminika	Orphenadrin	++	57
	Diphenhydramin	++	179
	Chlorcyclizin	++	43, 60

Fortsetzung Tab. C:

Pharmakologische Gruppe	Verbindung	Induktions- wirkung	Literatur
Hypoglykämika	Tolbutamid	+++	289, 307
	Carbutamid	++	289, 307
Sulfonamide	Sulfäthidol	0	289, 307
	Sulfanilamid	0	289, 307
Antibiotika	Chloramphenicol	(+++)	76
	Griseofulvin	++	68
	Rifampicin	(++++)	329
Steroide	Nortestosteron	+	32, 261
	Methyltestosteron	+	32
	Noräthanandrolon	+	261
	Noräthynodrel	+	172
	Spironolacton	+	141, 334, 351, 352, 359
	Lynestrol	+	28, 320
	Progesteron	0	172
	Mestranol	0	28
	PCN	++++	334, 351, 393
Verschiedene Verbindungen	SKF-525 A	(++)	63, 288
	Clofibrat	+/-	150, 174, 391
	Nikotin	+	23, 318, 392, 402
	DMSO	+	208
	PCB	++++	229
	Terpene	+++	380, 381
Insektizide	o,p'-DDD	+++	29, 218
	Chlordan	++++	149
	DDT	++++	117, 148, 201

Fortsetzung Tab. C:

Pharmakologische Gruppe	Verbindung	Induktions- wirkung	Literatur
	α - und γ - Hexachlorcyclo- hexan	++++	117, 149, 210, 211
	Dieldrin	+++	117, 149
	Aldrin	+++	148
	Toxaphen	+++	201
	Heptachlor	+++	148
	Heptachlorepoxyd	++	148
	Pyrethrum	0	148
Karzinogene Kohlenwasserstoffe	3-Methylcholanthren	+++	61, 66, 115
	3,4-Benzpyren	+++	1, 57, 62

2.2.3. Induktionsverlauf

2.2.3.1. Induktor

Substanzen wie z. B. bestimmte Insektizide, die nur sehr langsam in wasserlösliche, ausscheidbare Metaboliten umgewandelt werden, wirken so lange als Induktor, wie sie in genügender Konzentration in der Leber vorhanden sind. So kann bei Ratten nach chronischer DDT-Applikation der Fremdstoffmetabolismus in Abhängigkeit von der Dosis bis zu drei Monate nach der letzten Gabe erhöht sein (136, 295). Schon eine einmalige Injektion von DDT, die zur Induktion von etwa der gleichen Menge an Cyt P-450 führt wie eine einmalige PB-Gabe, bewirkt einen beträchtlich längeren Bestand der Erhöhung. Das Maximum wird nach sechs bis sieben Tagen (gegenüber ein bis zwei bei PB) erreicht. Der Anstieg hält vier bis fünf Wochen (gegenüber einer Woche bei PB) an. Ein ähnlicher Induktionsverlauf entwickelt sich, wenn eine kürzer wirkende Substanz kontinuierlich oder eine länger wirkende ein- oder zweimal täglich verabreicht wird: Nach drei bis vier Tagen wird ein Plateau erreicht, das ein neues Gleichgewichtsniveau anzeigt (297).

2.2.3.2. Enzymmuster

Als erstes Enzym im Induktionsgeschehen steigt die mitochondriale δ -Aminolävulinsäure-synthetase an. Der Grund dafür liegt in der sehr kurzen Halbwertszeit (HWZ) dieses Enzyms. Sie beträgt nur etwa eine Stunde (31, 248). Um den dynamischen Zustand des Cyt P-450 aufzuklären, bestimmte REMMER dessen Lebensdauer, indem er den Hämanteil mit radioaktiv markierter δ -Aminolävulinsäure kennzeichnete. Die HWZ von Cyt P-450 betrug sowohl bei PB-behandelten als auch bei Kontrollratten etwa 22 Stunden.

Die Zunahme und folgende Abnahme der Oxidationsrate nach einer einmaligen Dosis von PB wird von einem Anstieg und Abfall des Cyt P-450-Gehaltes der Leberzellen begleitet (Abb. III). Der Zeitverlauf der Induktion liefert einen weiteren Beweis von der Beteiligung des

Cyt P-450 an der Hydroxylierung von Fremdstoffen (87).

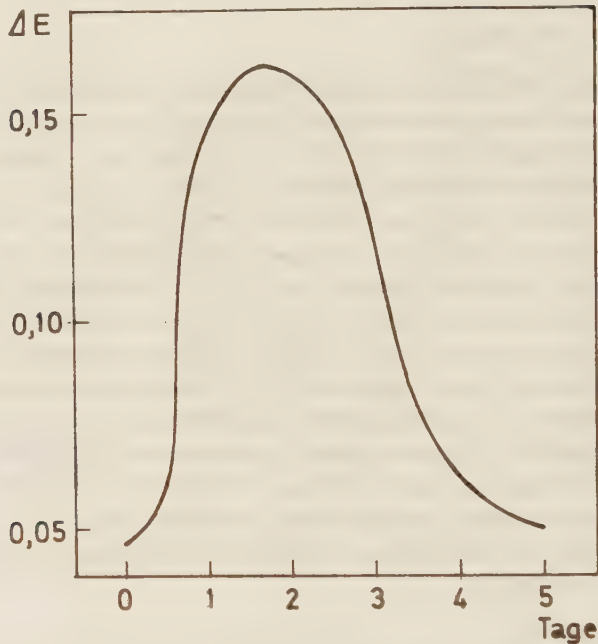


Abb. III: Zeitverlauf der Induktion von Cytochrom P-450 nach einer i. p. Injektion von 80 mg/kg K.-Gew. Phenobarbital (nach REMMER 297).

Während der Induktion des Fremdstoffmetabolismus durch PB verdreifacht sich der Gehalt an Cyt P-450 und der des NADP-abhängigen Flavoproteins verdoppelt sich. Etwa drei Prozent des Leberproteins entfallen während der Induktion auf Cyt P-450.

Auffallend war, daß die Glucuronyl-transferase zusammen mit dem Cyt P-450-Gehalt anstieg und abfiel, obwohl sie eine Phase II-Reaktion katalysiert (356).

Die in dieser Arbeit untersuchten Anilin- p-hydroxylierenden Aktivitäten stiegen und sanken ebenfalls parallel mit dem Cyt P-450-Gehalt (142).

Enzyme, die nicht am Fremdstoffwechsel beteiligt sind (z. B. Glucose-6-phosphatase und ATPase), erleben keinen Aktivitätszuwachs (302).

2.2.3.3. Wirkungsmechanismus

Dem Anstieg der Enzymmenge liegen eine erhöhte Syntheserate und/oder ein erniedrigter Abbau zugrunde. Im Fall des Cyt P-450 steht der erste Mechanismus im Vordergrund. Nur bei hungernden Tieren oder permanent hoher PB-Konzentration im Blut wird die Induktion dieses Enzyms durch zusätzliche Hemmung des Abbaus vergrößert (8, 137, 138, 220, 264, 339). Schon drei bis fünf Stunden nach PB-Gabe vergrößerten sich Häm- und Proteinsynthese (139, 220, Abb. IV). Auch isolierte Mikrosomen vorbehandelter Ratten bauten Aminosäuren schneller in ihr Protein ein als die Kontrollen (186).

Während es als weitgehend gesichert angesehen werden kann, daß nur solche Substanzen als Induktoren wirken können, die an Cyt P-450 gebunden werden und eine Konformationsänderung bewirken können, sind andere Fragen wie die Wirkung des Induktors auf Transkription und Translation, die mögliche Beteiligung eines Repressors und der primäre Induktionsmechanismus weitgehend ungeklärt.

Einige Untersucher konnten zeigen, daß die RNA-Polymeraseaktivität des Kerns während der ersten Stunden nach Gabe des Induktors beträchtlich ansteigt (36, 116). In der Folge wird die Transkriptionsrate vergrößert und mehr cytoplasmatische RNA gebildet (36, 217, 348, 401).

Zur verstärkten Bildung von Enzymen kommt es auch nach Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin D. Die Induktion muß also neben der Transkription auch die Translation beeinflussen (GELBOIN 376). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Aktivität der in den endoplasmatischen Membranen gebundenen RNasen während der Induktion beträchtlich abnimmt. Das könnte der Grund für die Abnahme des mRNA-Abbaus bzw. die Zunahme der HWZ der mRNA sein (165, 217, 225, 234, 235, 332b, 376).

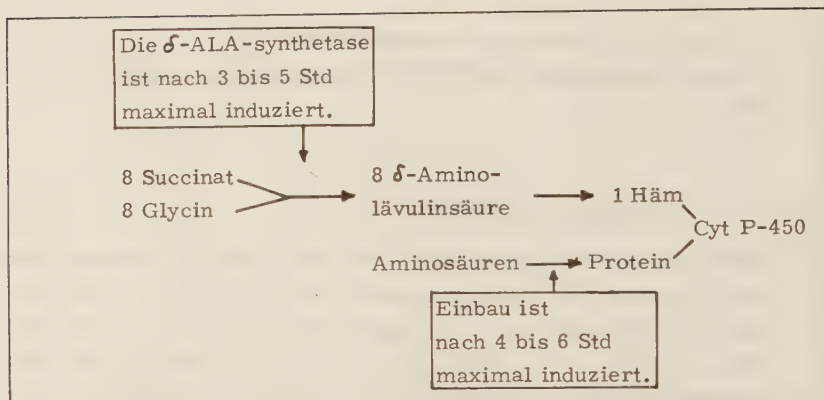


Abb. IV: Induktion der Häm- und Proteinsynthese nach einer PB-Dosis. Der limitierende Schritt bei der Häm-Bildung ist die Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-synthetase. Die Proteinsynthese findet in den Ribosomen an den rauhen Membranen des E.R. statt, während Häm in den Mitochondrien gebildet wird (nach REMMER 297).

2.2.4. Vermehrung des glatten Endoplasmatischen Reticulums

Während sich unter dem Einfluß induzierender Agentien das morphologische Erscheinungsbild der Kerne, Mitochondrien und der rauen Membranen nicht verändert, nehmen die glatten Membranen des Endoplasmatischen Reticulums (E.R.) erheblich zu. Sie bilden ein Gitterwerk von deutlich sichtbaren Tubuli, während normale Leberzellen nur kleine Bläschen zeigen, die schwer vom umgebenden Hyaloplasma zu unterscheiden sind (Abb. V a und b) (107, 265, 267, 301). Die Vermehrung des glatten E.R. kann auch biochemisch nachgewiesen werden: Der Gehalt an Protein und Lipiden in den glatten Membranen vergrößert sich nach Induktion auf mehr als das Doppelte. Das Wachstum der glatten Membranen ist mit einer typischen Hypertrophie der Leber verbunden (165, 216, 353). Wahrscheinlich ist die Hypertrophie ein Ausdruck des wegen der erhöhten Enzymsynthese vergrößerten Energiebedarfs der Leberzellen.

Im Gegensatz zu Phenobarbital und polycyclischen Kohlenwasserstoff-

Abb. V a:

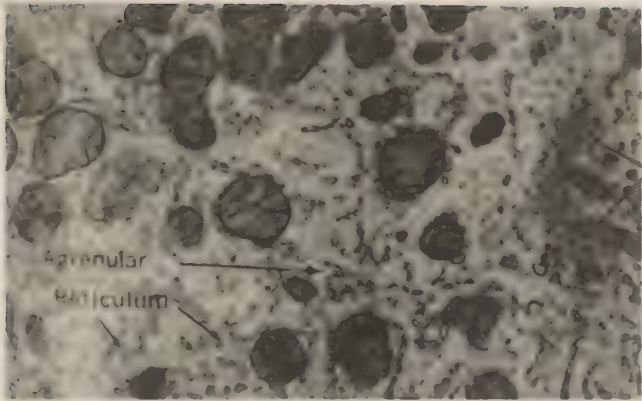


Abb. V b:

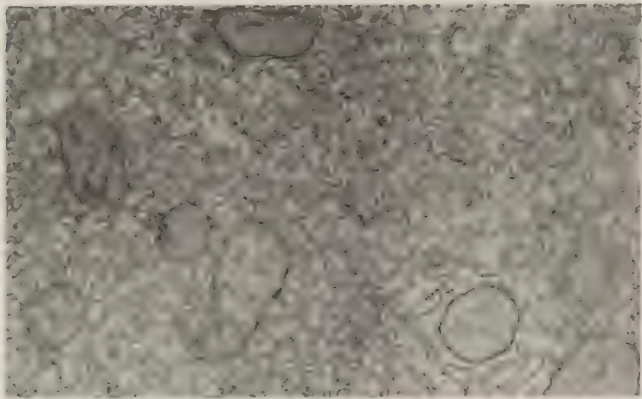


Abb. V: Glattes Endoplasmatisches Retikulum (Agranular Reticulum) der Leberzelle (nach FAWCETT, 96).

- a. Unbehandelt (16000fach vergrößert).
- b. 3 x 80 mg Phenobarbital/kg K.-Gew./Tag.
Aufarbeitung 24 Std nach der letzten PB-Gabe (38000fach vergrößert).

fen stimuliert das Pestizid α -Benzen-hexachlorid das Leberwachstum hauptsächlich über eine verstärkte Mitoserate der Hepatozyten (212). Die verschiedenartige Wirkung dieser letztgenannten induzierenden Substanz auf die Leberzellen konnte noch nicht erklärt werden (297).

2.2.5. Zusammenfassung der Eigenschaften der Induktoren

Chemische Verbindungen müssen folgende Eigenschaften haben um induzieren zu können:

1. Sie müssen genügend lipidlöslich sein. Je höher das Verhältnis von Lipid- zu Wasserlöslichkeit ist, desto größer ist die Induktionswirkung (55, 294 a). Wichtige Ausnahmen davon sind u. a. die meisten Alkaloide. Pethidin und Morphin beispielsweise besitzen keine Induktionswirkung (Tab. C).

2. Die Agentien müssen als Typ I-Verbindungen an den Proteinanteil von Cyt P-450 gebunden werden (Abb. VI). Die sogenannten Typ II-Verbindungen, die mit dem sechsten Liganden des Hämeisens reagieren, induzieren nur ihren eigenen und den Metabolismus von verwandten Substanzen, nicht aber den gesamten Fremdstoff-Metabolismus.

3. Der Kontakt zwischen dem Induktor und Cyt P-450 muß über eine gewisse Zeit aufrechterhalten werden. Obwohl Verbindungen wie Kurzzeit-Barbiturate sehr lipidlöslich sind und stark an Cyt P-450 gebunden werden, haben sie nur geringe Induktionswirkung, da sie sehr schnell oxidiert und dadurch vom Cyt P-450 abgelöst werden. So ist Hexobarbital, obwohl weit lipidlöslicher als PB, ein viel schwächerer Induktor als jenes. Es hat in vivo bei männlichen Ratten eine HWZ von etwa einer Stunde, während die HWZ von PB etwa elf Stunden beträgt (297).

4. Die Konzentration des Induktors in der Leber muß ein genügend hohes Niveau erreichen oder der Induktor muß eine hohe Affinität zu dem induzierten Enzym haben (294 a). Viele Verbindungen erreichen niemals das für die Induktion notwendige Niveau, da ihre hohe Toxizi-

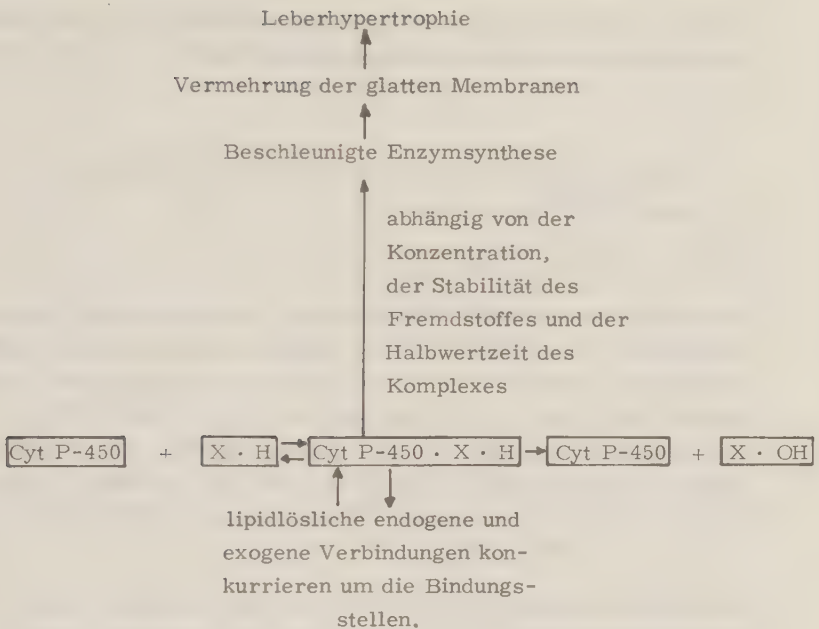


Abb. VI: Wahrscheinlicher Mechanismus der reversiblen Bindung von Fremdstoffen an Cyt P-450 als notwendiger Schritt für die Hydroxylierung und als wahrscheinlicher Auslöser für die beschleunigte Synthese des Fremdstoff-metabolisierenden Enzymsystems (nach REMMER, 297).

$\text{X} \cdot \text{H}$ = Fremdstoff

tät schon vorher zum Tode führt. Als Beispiele seien Antikoagulantien sowie die meisten Alkaloide genannt (289).

5. Wenn ein Substrat eine geringe Affinität zu Cyt P-450 hat, kann seine Hydroxylierungsrate durch den an das Cyt P-450 gebundenen Induktor gehemmt werden, was den wirklichen Anstieg der Enzymaktivität verdeckt (62, 342). So haben 1,1-Diphenyl-1-propyl-essigsäure-2'-diäthylaminoäthylester (= SKF-525 A) und verwandte Substanzen eine zweiphasische Wirkung: Solange sie an Cyt P-450 gebunden sind (ein oder zwei Tage nach ihrer Verabreichung) hemmen sie den Fremdstoffmetabolismus. Erst nachdem sie aus den Leberzellen verschwun-

den sind, wird die induzierte Enzymmenge frei verfügbar und die Rate der Fremdstoff-Hydroxylierung steigt an (288).

2. 3. Faktoren mit Einfluß auf die Enzymaktivitäten und ihre Induktion

2. 3. 1. Art des Induktors

PB, DDT und andere Typ I-Verbindungen beschleunigen alle oxidativen Reaktionen, an denen Cyt P-450 beteiligt ist, während Typ II-Verbindungen, wie die polycyclischen Kohlenwasserstoffe Benzpyren (292) und Methylcholanthren (157), nur den Metabolismus von Substanzen des gleichen Bindungstyps stimulieren. Es ist anzunehmen, daß die genannten Carcinogene einen anderen Typ von Cyt P-450 induzieren, der an der Oxidation von Typ I-Verbindungen nicht beteiligt ist (7, 91, 157, 167, 233, 344 - 346).

Bei Untersuchungen zur Wirkung von Steroiden auf den Fremdstoff-metabolismus zeigte 3 β -Hydroxy-20-oxo-5-pregnen-16 α -carbonitril (PCN) (333, 334, 335), das keinerlei Hormonwirkung hat, ein eigentümliches Verhalten. Zwar bewirkte es sowohl Hypertrophie des glatten E.R. (113, 114) als auch Vermehrung des Cyt P-450-Gehalts (351), jedoch stimulierte es die Oxidation von Barbituraten in wesentlich geringerem Maße als Typ I-Verbindungen, während es die Demethylierung von Äthylmorphin stärker erhöhte als Typ I-Verbindungen (Tab. D, 393).

2. 3. 2. Species und Stamm

Die einzelnen Tierarten und -stämme unterscheiden sich erheblich in ihrer Fähigkeit Fremdstoffe zu metabolisieren. Der Grund dafür sind genetisch bedingte qualitative und quantitative Unterschiede in der Enzymausstattung. Im allgemeinen metabolisieren Carnivoren Arzneimittel verhältnismäßig langsam oder überhaupt nicht. So können z. B. Katzen Phenazetin und Azetanilid nicht abbauen, da sie keine geeig-

neten Enzymsysteme dafür besitzen. Die Substanzen führen hier zu Methämoglobinbildung und Hämolyse. Hunde können Hydrazinderivate nicht schnell genug azetylieren, weshalb es ebenfalls zu Hämolyse kommt (396).

Auch zwischen Maus, Ratte und Kaninchen zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Enzymausstattung. Da die Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme der Rattenleber-Mikrosomen stärker bzw. schneller inaktiviert werden als jene der Mäuse- oder Kaninchenleber-Mikrosomen, zeigt der Metabolismus an in vitro inkubierten Rattenleber-Mikrosomen nur etwa 15 Minuten lang gleichbleibende Reaktionsgeschwindigkeit, während er an Mikrosomen der beiden anderen Tierarten 60 bis 90 Minuten lang linear bleibt (131). Speciesunterschiede ergaben sich auch hinsichtlich der Wirksamkeit verschiedener Induktoren. So zeigen Mäuse im Gegensatz zu Ratten geringere Reaktion auf DDT und Benzpyren (104, 105, 144) und eine Abnahme der Anilin-p-hydroxylierung nach längerer Gabe von Thyroxin (58, 88, 191).

Erhebliche Speciesunterschiede sind auch von den in vorliegender Arbeit untersuchten Aktivitäten Anilin-hydroxylierender Enzyme bekannt. Die Hydroxylierung von Anilin ist in ortho- und para-Stellung möglich. Bei Hund, Katze und Frettchen ist das Verhältnis $p/o \leq 1$, während es bei anderen Tierarten von 3 bis 6 (Maus, Ratte und Kaninchen) bis etwa 15 bei der Wüstenrennmaus (Unterfamilie: Gerbillinae) variiert (397).

Auch die biologische Halbwertszeit von Anilin im Blutplasma weist erhebliche Speciesunterschiede auf. Sie reicht von 35 Minuten bei Maus und Kaninchen über 45 Minuten beim Meerschweinchen und 71 Minuten bei der Ratte bis zu 167 Minuten beim Hund (277).

Da demnach Tierarten, die bevorzugt in p-Stellung hydroxylieren, auch den höchsten Umsatz an Anilin haben, scheint die p-Hydroxylierung die entscheidende Phase I-Reaktion im Metabolismus von Anilin zu sein.

Auch zwischen Tierstämmen treten genetisch bedingte Unterschiede der Enzymsysteme auf. Signifikante Unterschiede der Hydroxylierungsrate wurden zwischen verschiedenen Mäusestämmen festgestellt (169,

236). Die Standardabweichung der Hexobarbitalschlafzeit war bei Nicht-Inzuchtstämmen am größten. Am geringsten war dementsprechend die Standardabweichung bei Tieren von Inzuchtstämmen aus dem gleichen Wurf (381).

Auch die Induzierbarkeit der Enzyme ist vom Tierstamm abhängig. Unterschiede ergaben sich u. a. in der Wirksamkeit von DDT, Eukalyptol und PB auf verschiedene Rattenstämme. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel ist das Verhalten der Aktivität der Cholesterol-~~7 α~~ -hydroxylase, welche durch PB-Gabe bei Wistar-Ratten versechsfacht wurde, während sie bei Sprague-Dawley-Ratten unverändert blieb (337).

2.3.3. Geschlecht

Männliche Ratten weisen einen gegenüber Weibchen höheren Umsatz an Typ I-Verbindungen auf, während Typ II-Verbindungen von beiden Geschlechtern in ungefähr gleichem Umfang metabolisiert werden (42, 161, 271, 275, 276, 310, 400). Der Metabolismus von Aminopyrin und Hexobarbital (Typ I-Verbindungen) an Lebermikrosomen männlicher Ratten wird durch Adrenalektomie, Kastration, Hypoxie oder die Gabe von ACTH, Formaldehyd, Epinephrin, Morphin, Alloxan oder Thyroxin vermindert, während der Umsatz von Anilin und Zoxazolamin (Typ II-Verbindungen) unter dem Einfluß dieser Behandlungen nicht merklich abnimmt (182, 185). Dagegen wird die Aktivität von Lebermikrosomen weiblicher Ratten durch die oben genannten Einflüsse nicht abgeschwächt, sondern z. T. sogar erhöht. Bei kastrierten Ratten beiderlei Geschlechts treten die oben erwähnten Abschwächungen der Enzymaktivitäten erst nach Gabe von Methyltestosteron auf (183, 185). Die bei Ratten nachgewiesenen Geschlechtsunterschiede in der Metabolismusrate von Fremdstoffen werden durch Nahrungsentzug praktisch aufgehoben (KATO 182, 183, 184).

Die geschlechtsabhängig unterschiedliche Oxidationsrate von Typ I-Verbindungen kann nicht durch eine größere Menge an Cyt P-450 oder eine erhöhte Reduktionsrate von Cyt P-450, wahrscheinlich aber über eine verschieden starke Bindung von Typ I-Verbindungen an Cyt P-450

erklärt werden (69, 321). Der charakteristische Peak des Cyt P-450 - Hexobarbital-Bindungsspektrums ist bei männlichen Tieren stärker ausgeprägt und verweist hier auf eine intensivere Bindung (297). Die durch Induktion erreichbare maximale Aktivität des Fremdstoff-metabolisierenden Enzymsystems ist trotz der höheren Basisaktivität männlicher Ratten bei beiden Geschlechtern im Wesentlichen gleich (294 a).

Geschlechtsunterschiede in der Reaktion auf verschiedene Einflüsse ergaben sich nur bei Ratten, nicht dagegen bei Mäusen und Kaninchen (52, 191).

2.3.4. Trächtigkeit

Bei trächtigen Wistar-Ratten bewirkte PB weder eine Verkürzung der Hexobarbitalschlafzeit noch eine Erhöhung des Cyt P-450-Gehalts (255, 325). Zu berücksichtigen bleibt jedoch, daß Gewicht, glattes E.R. und Cyt P-450-Gehalt der Lebern von trächtigen Ratten identisch mit den entsprechenden Werten von PB-behandelten nichtträchtigen Ratten waren.

Daß dieser Befund nur beschränkt verallgemeinerungsfähig ist, zeigen die folgenden Untersuchungen: Die Benzpyren-hydroxylase ließ sich durch Gabe von Benzpyren bei trächtigen Wistar-Ratten im gleichen Maße wie bei nichtträchtigen induzieren (323, 326).

Andere Autoren berichteten von einer Erhöhung des Cyt P-450-Gehalts nach PB-Gabe an trächtige Sprague-Dawley-Ratten (390). Auch bei trächtigen Kaninchen bewirkte PB-Gabe den gleichen Anstieg der Cytochrome wie bei nichtträchtigen (255). Es scheinen also genetische Einflüsse wirksam zu sein, die die Reaktion auf Fremdstoffe unter extremen physiologischen Bedingungen wie Trächtigkeit in unterschiedlicher Weise bestimmen.

2.3.5. Alter

Das Fremdstoff-metabolisierende Enzymsystem entwickelt sich erst nach der Geburt und steigt bei allen untersuchten Tieren (Maus, Ratte, Kaninchen) schnell während der ersten Lebenswochen an (103, 106, 170, 242, 365). Es ist nach etwa zehn Wochen fertig ausgebildet (242).

Die Höhe der Induzierbarkeit ist stark altersabhängig. In den ersten Lebenstagen, wenn die Rate des Fremdstoff-Metabolismus noch sehr niedrig ist, läßt sich dieser viel stärker als in jeder anderen Lebensphase induzieren (324): 1/10 der PB-Dosis erzeugt bei säugenden Ratten beinahe den gleichen Induktionsgrad wie die volle Dosis bei erwachsenen Tieren (294 a).

Der bei alten Ratten (600 Tage) beobachtete Aktivitätsabfall der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme wurde bei alten Mäusen (50 Wochen) nicht festgestellt (188, 189, 190, 192 b).

2.3.6. Ernährung

Die Fremdstoffoxidation nimmt im Hungerzustand im allgemeinen ab (77, 178, 183). Als Ursachen kommen vor allem ein vermindertes Angebot von NADPH (366) und Cyt P-450 (30) in Betracht. Gleichzeitig vergrößert sich die Michaeliskonstante (K_M) der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme (121). Eine Ausnahme bildet offenbar die Anilin-p-hydroxylase: ihre Aktivität nimmt bei hungrigen Ratten zu (182, 183, 184).

Proteinmangeldiät vermindert bei männlichen Ratten die Hydroxylierungsrate und den Cyt P-450-Gehalt auf weniger als 1/3 der Norm (187, 240, 241, 270) und schwächt auch die Induzierbarkeit der Leber durch DDT und PB beträchtlich ab (181, 241, 270).

Essentielle Fettsäuren sind wichtig für die Aktivität der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme und vor allem für deren Induktion (NORRED 164). Aus diesem Grunde wurde ihnen ein "permissive effect" bei der Induktion zugesprochen (246, 247), wobei ihre Bindung an Cyt P-450

bedeutsam sein soll.

Nach mehrwöchiger Fütterung mit fettfreier oder Fettsäuremangel-diät (enthält keine essentiellen Fettsäuren) verminderten sich die Aktivitäten der Fremdstoff-hydroxylierenden Enzyme (z. B. der Anilin-p-hydroxylase (AH) und der Äthylmorphin-N-demethylase) und der Cyt P-450-Gehalt von Lebermikrosomen männlicher Ratten erheblich (175, 258, 270). Induktion durch PB oder DDT war zwar möglich, jedoch betrug die Aktivität der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme nur 1/3 der normal gefütterten Kontrollen. Diese Veränderungen konnten durch Gabe mehrfach ungesättigter Fettsäuren verhindert bzw. rückgängig gemacht werden. Die Art der Nahrungslipide hat auch eine grundlegende Wirkung auf die Zusammensetzung der Phospholipide der mikrosomalen Membranen (258). Phospholipide sind wichtig für die Aufrechterhaltung der aktiven Form des Cyt P-450 und für die Unversehrtheit der Typ I-Bindungsstellen (50). Überraschenderweise sinkt der Phospholipidgehalt (Bezug: 1,0 mg Gesamtlipid) nach PB-Gabe (19). Diese relative Verminderung des Phospholipidgehaltes scheint aber auf eine Zunahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den mikrosomalen Membranen zurückzuführen zu sein (10).

2.3.7. Käfighygiene

Wurden die Ausscheidungen von in Maschendrahtkäfigen ohne Einstreu gehaltenen Ratten eine Woche lang nicht entfernt, so verringerten sich die Aktivitäten von Anilin-p-hydroxylase und Äthylmorphin-N-Demethylase sowie der Cyt P-450-Gehalt der Lebermikrosomen (382). Die Haltung in massiven, mit Filterpapier abgedeckten Käfigen führte trotz zweimal-täglicher Reinigung ebenfalls zu vermindertem Fremdstoff-metabolismus. Die Anreicherung der Atemluft mit aus Harnstoff gebildetem Ammoniak, die durch die Gegenwart von Urease-positiven Bakterien im Kot noch verstärkt wird (38), bewirkt offensichtlich eine Störung der mikrosomalen Aktivitäten (382, 389).

2.3.8. Einstreu

Wurden Mäuse oder Ratten in Käfigen auf Weichholzeinstreu (Rotzeder, Weißkiefer, Ponderosakiefer) gehalten, so waren ihre Hexobarbital-schlafzeit gegenüber Haltung auf künstlicher oder Hartholzeinstreu (Buche, Birke, Ahorn) um die Hälfte verkürzt und die Aktivitäten von Hexobarbital-oxidase, Anilin-hydroxylase und Äthylmorphin-N-demethylase verdoppelt (100, 380, 381). Der Grund dafür ist die Induktion der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme durch in den Nadelhölzern enthaltene Terpene, die entweder durch Ingestion oder durch Inhalation in den Tierkörper gelangen (380, 381).

2.3.9. Weitere Faktoren

Weitere untersuchte Faktoren sind: Umgebungstemperatur (381), Populationsdichte (381), Tages- und Jahreszeit (21, 71, 381), Zusammensetzung der Atemluft (120), hormoneller Status (CATZ 320), Tumoren (2, 78, 313), Käfigform (399), Applikationsart und -Volumen verabreichter Arzneimittel (46).

Die Übersicht über Faktoren mit Einfluß auf den Fremdstoff-Metabolismus bleibt notwendigerweise unvollständig. Sie genügt aber bereits, um einerseits auf die Notwendigkeit hochstandardisierter Versuchsbedingungen und andererseits auf mögliche Ursachen fehlender Vergleichs- und Reproduzierbarkeit hinzuweisen.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Reagentien und Tiermaterial

3.1.1. Reagentien

1. Actinomycin D, krist., 98 % rein, SERVA, Heidelberg, Nr. 10710
2. Äther(Diäthyläther, DAB 7), MERCK, Darmstadt, Nr. 926
3. DL-Aethionin, SCHUCHARDT, München, Nr. AE 193
4. Albumin, Hühnereiweiß, RIEDEL-DE-HAEN A.G., Hannover, Nr. 1337
5. p-Aminophenol (4-Aminophenol), zur Synthese, MERCK, Nr. 421
6. n-Amylalkohol, p.a., MERCK, Nr. 975
7. Anilin, p.s., MERCK, Nr. 1261
8. Chloroform, DAB 7, MERCK, Nr. 2431
9. Cycloheximid (Actidion), rein, SERVA, Nr. 10700
10. Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz, BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Mannheim, Nr. 15307
11. Kaliumchlorid, p.a., MERCK, Nr. 4936
12. Kaliumjodid, p.a., MERCK, Nr. 5043
13. Kohlenmonoxid, GERLING, HOLZ & CO, Hamburg
14. Kupfersulfat, p.a., MERCK, Nr. 2790
15. Magnesiumchlorid, p.a., MERCK, Nr. 5833
16. Natriumchlorid, krist., p.a., MERCK, Nr. 6404
17. Natriumdithionit, p.a., MERCK, Nr. 6507
18. Natronlauge, Titrisol^R, 0,1 N, MERCK, Nr. 9959
19. Nicotinamid, DAB 7, EGA-CHEMIE KG, Steinheim, Nr. N 755-9
20. NADP⁺ (Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat), Dinatriumsalz, BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Nr. 15600
21. Phenobarbital (Natrium-5-phenyl-5-äthyl-barbiturat), SCHUCHARDT, Nr. AE 167

22. Phenol, DAB 6, RIEDEL-DE-HAEN A.G., Nr. 16016
23. Salzsäure, Titrisol^R, 0,1 N, MERCK, Nr. 9973
24. Seignettesalz (Kalium-Natrium-Tartrat), p.a., MERCK, Nr. 8087
25. 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin, Triethylene melamine substance (TEM), LEDERLE LABORATORIES DIVISION, New York, Nr. 2705-J 7539 und Nr. 2075-J 0710 *
26. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Puffersubstanz, MERCK, Nr. 8382

* An dieser Stelle möchte ich der LEDERLE LABORATORIES DIVISION, New York, für die freundliche Überlassung der TEM-Präparate danken.

3.1.2. Versuchstiere

Als Tiermaterial dienten ca. 1500 weibliche Albinomäuse. Die Tiere stammten teils aus institutseigener konventioneller Zucht, teils aus einem NMRI-Stamm der Firma MUS-RATTUS (Brunnthal bei München). Bei Versuchsbeginn hatten die Mäuse ein Gewicht von $20,7 \pm 2,7$ Gramm. Soweit männliche Tiere verwendet wurden, ist dies im Ergebnisteil besonders vermerkt.

3.1.3. Haltung und Fütterung der Tiere

Die Mäuse wurden vor und während der Versuche in Makrolonkäfigen nach SPIEGEL und GÖNNERT (Größe: 25 x 21 x 15 cm) in Gruppen bis zu 20 Tieren bei Zimmertemperatur gehalten. Als Einstreu wurden Hobelspäne mit hohem Weichholzanteil verwendet. Sofern die Versuche mehrere Tage dauerten, wurde die Einstreu alle zwei Tage gewechselt. Altromin^R-Pressfutter (ALTROGGE-KRAFTFUTTER GmbH, Lage, Lippe) und Wasser standen, soweit bei den einzelnen Versuchen nicht anders vermerkt, ad libitum zur Verfügung.

3.1.4. Behandlung der Tiere

3.1.4.1. Bestrahlung

Die Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB) von maximal fünf Mäusen erfolgte in einem oben offenen zylindrischen Glasgefäß (Durchmesser 13,6 cm) mit dem Röntgengerät "Kristalloflex 4" der Firma SIEMENS & HALSKE AG, München.

Technische Daten:

Röhrenspannung	55 KV
Stromstärke	30 mA
Halbwertschicht (HWS)	0,16 mm Cu
Filter	0,16 mm Cu
Abstand Fokus/Gefäßboden	20,5 cm
Oberflächendosisleistung	51 R/min, davon wurden 17 R/min vom Tierkörper absorbiert

Die Dauer der Bestrahlung betrug 3 bis 48 Minuten. Als Kontrolle diente jeweils eine Gruppe von Mäusen, welche die gleiche Zeit in die Bestrahlungsapparatur gesetzt wurde, ohne bestrahlt zu werden (Scheinbestrahlung).

3.1.4.2. Applikation von Phenobarbital, Hemmstoffen der Proteinsynthese und 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin

Die Substanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit einer 1 ml-Tuberkulinspritze (Kanüle Nr. 20) in eine Schwanzvene injiziert. Die Konzentration der Lösungen war so gewählt, daß die Applikation von 0,01 ml/g Körpergewicht die gewünschte Wirkstoffmenge in mg/kg K.-Gew. ergab. Die Lösungen wurden (mit Ausnahme der Actinomycin D-Lösung) stets vor der Injektion frisch hergestellt. Die Actinomycin D-Lösung wurde in einer Konzentration von 0,06 mg/ml in 2 ml-Portionen in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Als Kontrolle diente jeweils eine Gruppe von Mäusen, denen das gleiche Volumen (0,01 ml/g K.-Gew.) physiologische Kochsalzlösung injiziert worden war.

3.1.5. Aufarbeitung der Tiere

Die Mäuse wurden gewogen und anschließend in oberflächlicher Chloroform-Narkose mit einem Scherenschlag dekapitiert. Unmittelbar nach der Ausblutung wurden die Lebern entnommen.

3.1.6. Verarbeitung der Lebern

Die Lebern wurden mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, vorsichtig mit Zellstoff abgetrocknet und gewogen. Dann wurden sie entweder sofort weiterverarbeitet oder eingefroren.

Als Homogenisationsmedium diente eine eisgekühlte Lösung von:

Tris-HCl-Puffer (pH 7,8)	10	mmol/l
Kaliumchlorid	0,15	mol/l
Nicotinamid	5	mmol/l

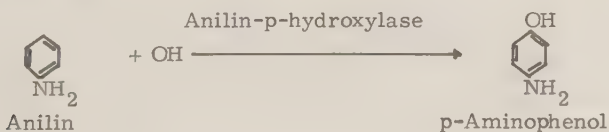
Die Lebern wurden bei Gruppenaufarbeitung (je fünf Tiere) im Verhältnis 1 zu 5 (G/V) verdünnt. Bei Einzelaufarbeitungen wurde das Verdünnungsverhältnis größer gewählt, um ausreichende Probevolumina zu erhalten. Die Homogenisation erfolgte ca. 1,5 Minuten lang bei 1500 U/min unter Eiswasserkühlung in einem Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM (Potter S der Firma B. BRAUN, Apparatebau, Melsungen, zweimaliges Auf- und Abbewegen eines Teflonkolbens im 15-ml oder 30-ml-Glasgefäß). Anschließend wurde das so gewonnene Leberhomogenat sofort in einer Ultrazentrifuge (Typ Spinco L2, Rotor Ti 50 der Firma BECKMAN INSTRUMENTS INC., Fullerton, Kalifornien) 25 Minuten bei 12500 x g geschleudert. Von dem unter einer Fettschicht liegenden postmitochondrialen Überstand (im Weiteren als "mikrosomaler" Überstand bezeichnet) wurden ca. 5 ml mit einer Re-kordspritze abgezogen.

3.2. Bestimmung der Aktivität der Anilin-p-hydroxylase

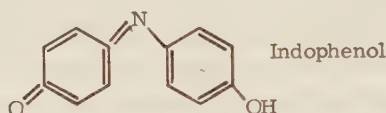
3.2.1. Prinzip

Als Grundlage für die Bestimmung der Anilin-p-hydroxylase-Aktivität wurden die Arbeitsvorschriften von BRODIE und AXELROD (39), von HILTON und SARTORELLI (158) und von KATO und GILLETTE (183) verwendet, in einigen Punkten aber verändert.

Anilin wird durch hydroxylierende Aktivitäten der Leber, der Einfachheit halber allgemein als Anilin-p-hydroxylase (AH) bezeichnet, zu p-Aminophenol (p-AP) (= p-Hydroxyanilin) metabolisiert, indem eine OH-Gruppe angelagert wird:



Die pro Zeiteinheit gebildete p-AP-Menge ist der Anilin-p-hydroxylase-Aktivität proportional und kann nach Zugabe von phenolischer Natronlauge bei 620 nm spektrophotometrisch gemessen werden. Ursache für die dabei auftretende Farbentwicklung ist die gemeinsame Oxidation von p-Aminophenol und Phenol zu Indophenol, wobei dessen p-chinoider Ring in Verbindung mit einer Hydroxylgruppe farbgebend ist (312):



3.2.2. Lösungen

Reaktionsmedium für die Anilin-p-hydroxylase-Bestimmung:

Tris-HCl-Puffer (pH 7,8)	0,2	mol/l
Magnesiumchlorid	10	mmol/l
Nicotinamid	40	mmol/l
NADP ⁺	0,3	mmol/l
Glucose-6-phosphat	10	mmol/l
Anilin	8	mmol/l

Extraktionsmedium:

Diäthyl-Äther mit 0,3 Prozent Amylalkohol

Farbreaktionslösung:

0,1 N Natronlauge mit 1 % Phenol

3.2.3. Ausführung

Die Anilinhydroxylase-Bestimmungen wurden mit dem nach 3.1.6. gewonnenen "mikrosomalen" Überstand als Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei jeweils 0,5 ml Überstand mit 0,5 ml Reaktionsmedium in ein Reagensglas pipettiert und 15 min in einem Schüttelthermostat

(hauseigenes Modell) mit einer Amplitude von 20 mm und einer Frequenz von 200/min bei 37° C mit atmosphärischem Sauerstoff inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurde die Reaktion sofort durch Zusatz von 5 ml eiskaltem (1 Std Kühltruhe) Äther mit 0,3 % Amylalkohol gestoppt und kräftig durchgeschüttelt, um das entstandene p-AP in die Ätherphase zu überführen. Zur Trennung der Ätherphase von der wäßrigen Phase wurden die Proben 30 min eingefroren. Anschließend wurde die Ätherphase dekantiert, mit 5 ml phenolischer Natronlauge versetzt und 20mal kräftig geschüttelt. Von der untenstehenden wäßrigen (alkalischen) Phase wurden ca. 3 ml abpipettiert und nach 60 min. Farbentwicklung bei 620 nm in 1 cm-Glasküvetten gegen phenolische Natronlauge photometriert (Spektralphotometer PMQ II, C. ZEISS, Oberkochen).

3.2.4. Meßgrößen

Als Meßgröße für die Aktivität der Anilin-p-Hydroxylase diente die Bildung von p-AP aus Anilin (15 min, 37° C).

Aus den Extinktionsdifferenzen zwischen Probe und Blindwert wurden die Meßwerte (Einheit = nmol/ml) über eine Eichkurve ermittelt, welche anhand einer p-AP-Verdünnungsreihe (wie unter 3.2.3. der Indophenol-Farbreaktion unterworfen) aufgestellt worden war.

Die Extinktionsdifferenz von 0,002 entsprach einer Konzentration von 1,0 nmol p-AP/ml Überstand.

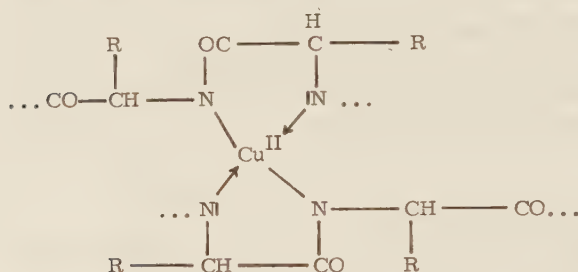
3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration des "mikrosomalen" Überstandes

3.3.1. Prinzip

Die Proteinkonzentration wurde mit der von BÜCHER et al. vereinfachten Biuretmethode gemessen (24). Bei Zusatz von Kupfersulfat zu einer alkalischen Polypeptidlösung entsteht eine violette Farblösung mit einem Extinktionsmaximum bei 546 nm. Die Extinktionsdifferenz zwischen

proteinhaltigem Reaktionsgemisch und proteinfreiem Reagentienleerwert ist der Proteinkonzentration proportional.

Die Kupferionen bilden mit Eiweißen und Aminosäuren gefärbte Komplexe, die eine Ausfällung von Kupferhydroxid verhindern. Für diese Reaktion muß eine Verbindung mindst. zwei $-\text{CO}-\text{NH}-$ Gruppen haben (33,312).



Es kommt hier jedoch nicht zur Ausbildung eines Biuret-moleküls ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), so daß man nur von einer "biuretähnlichen" Reaktion sprechen kann (27).

3.3.2. Lösungen

Physiologische Kochsalzlösung:

Natriumchlorid 0,14 mol/l dest. Wasser

Biuret-Reagens:

32 mmol Seignettesalz wurden in ca. 400 ml 0,2 N Natronlauge gelöst. Der Lösung wurden nacheinander 12 mmol feingepulvertes Kupfersulfat und 30 mmol Kaliumjodid zugesetzt. Dabei mußte jedes Salz vor Zugabe des nächsten vollständig gelöst sein. Anschließend wurde die Lösung mit 0,2 N Natronlauge auf 1000 ml ergänzt.

3.3.3. Ausführung

Jede Proteinbestimmung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. 0,5 ml des mit physiol. NaCl-Lösung im Verhältnis 1 zu 10 (bei Gruppenaufarbeitung) bzw. 1 zu 7 (bei Einzelaufarbeitung) verdünnten "mikrosomalen" Überstandes wurden mit 5,0 ml Biuret-Reagens versetzt und nach 30 Minuten in 2,0 cm-Glasküvetten bei 546 nm photometriert. Die Vergleichsküvette wurde entsprechend mit einem Gemisch aus 0,5 ml physiol. NaCl-Lösung und 5,0 ml Biuret-Reagens beschickt. Die Extinktionsdifferenz ist dem Proteingehalt proportional.

3.3.4. Berechnung

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Albumin-Verdünnungsreihe. Eine Extinktionsdifferenz von 0,004 entsprach dabei 1 mg Protein/ml "mikrosomalem" Überstand.

3.4. Bestimmung des Cytochrom P-450

3.4.1. Prinzip

Der Cytochrom P-450-Gehalt von Lebermikrosomen wurde mit einer nach IMAI (167) modifizierten Methode gemessen.

Cytochrom P-450 kann nach Reduktion seines Eisenatoms und nachfolgender Überführung in einen Kohlenmonoxid-Komplex quantitativ bestimmt werden (91). Dieser Komplex ist durch seinen Absorptionspeak bei 450 nm charakterisiert.

3.4.2. Lösungen und Reagentien

Kaliumchloridlösung: 0,15 mol/l dest. Wasser

Tris-HCl-Pufferlösung: 0,2 mol Tris/l dest. Wasser

Natriumdithionit

Kohlenmonoxid

3.4.3. Ausführung

Die Lebern wurden mit einer Schere zerkleinert und in KCl-Lösung gespült. Anschließend wurden sie mit einem Metallspatel durch ein verzinktes Sieb (Maschenweite 1,5 mm) gepreßt und mit KCl-Lösung im Verhältnis 1 zu 3 (G/V) verdünnt. Nach 30 Minuten langsamem Schütteln unter Eiswasserkühlung wurde das Lebergewebe 20 Minuten bei $9000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 60 Minuten bei $75000 \times g$ zentrifugiert, der hierbei erhaltene Überstand etwa zur Hälfte dekantiert und das Zentrifugenröhrchen wieder mit KCl-Lösung aufgefüllt. Nach erneutem Schleudern (30 Minuten bei $75000 \times g$) wurde das Sediment behutsam in KCl-Lösung resuspendiert und gewaschen (nochmaliges Zentrifugieren bei $75000 \times g$, 30 min). Das so gewonnene Mikrosomen-Pellet wurde vorsichtig in 2 ml Tris-Pufferlösung unter Eiswasserkühlung von Hand in einem Glaspotter homogenisiert. Nach Einstellung der Mikrosomensuspension auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml durch Verdünnung mit Tris-Puffer wurden die Mikrosomen mit einigen Kristallen Natriumdithionit reduziert. Zwei 1 cm-Glasküvetten wurden mit der reduzierten Mikrosomensuspension beschickt und eine davon (Probenküvette) mit Kohlenmonoxid eine Minute lang begast. Das Differenzspektrum zwischen Proben- und Referenzküvette wurde im Bereich von 500 nm bis 420 nm aufgezeichnet (Zweistrahl-Differenz-Spektrophotometer DB-GT der Firma BECKMAN).

3.4.4. Berechnung

Zur Berechnung des Cyt P-450-Gehaltes wurde von der Extinktion im Absorptionsmaximum bei 450 nm die der Basis bei 500 nm abgezogen. Eine Extinktionsdifferenz von 0,0364 entsprach dabei einem nmol Cyt P-450/mg Protein.

3.5. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert einer Versuchsreihe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Erläuterung der Indices:

s_x = Standardabweichung

x_i = Einzelwert einer Stichprobe

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Stichproben

n = Anzahl der Stichproben

Die Signifikanzanalyse erfolgte nach dem "t-Test" (48), wobei ein Wert von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet wurde.

Korrelationskoeffizient und lineare Regression wurden mit dem Elektronenrechner "Algotronic" der Firma DIEHL, Nürnberg, ermittelt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Reaktionsbedingungen für die p-Hydroxylierung von Anilin

4.1.1. Enzymkonzentration

Der Substratumsatz durch "mikrosomale" Überstände, die aus 1 : 5 bis 1 : 40 (G/V) verdünnten Homogenaten gewonnen worden waren, war unter den gewählten Bedingungen der Enzymkonzentration direkt proportional (Abb. 1).

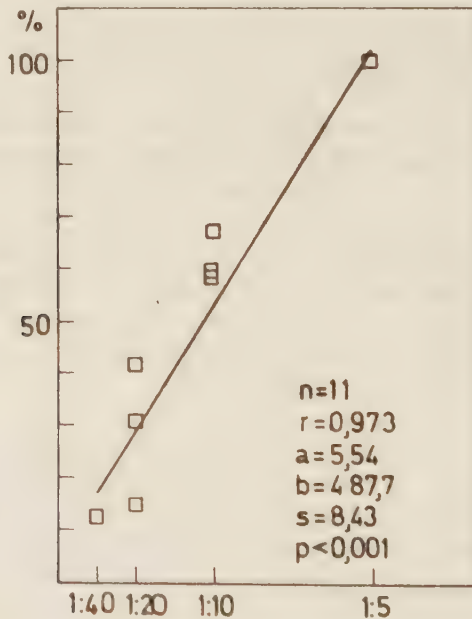


Abb. 1: Anilin-Umsatz in Abhängigkeit von der Homogenatverdünnung (Enzymkonzentration).

Abszisse: Homogenatverdünnung in G/V

Ordinate: Substratumsatz in Prozent, bezogen auf den bei Homogenatverdünnungen entsprechend 1/5 gemessenen Wert

Erläuterungen zu den nachfolgenden Abb. und Tab.:

Abkürzungen:

NaCl:	NaCl-Kontrollen
PB:	PB-Kontrollen (100 mg/kg K. -Gew.)
K. -Gew.:	Körpergewicht der Mäuse in g
a. L. -Gew.:	absolutes Gewicht der Leber in g
r. L. -Gew.:	relatives Gewicht der Leber in Prozent des K. -Gew.
AH/F. -Gew.:	Aktivität der Anilin-p-hydroxylase, bezogen auf Leber-Frischgewicht, in nmol p-Aminophenol/ml "mikrosomalem" Überstand/15 min Inkubation
Protein:	mg Protein/ml "mikrosomalem" Überstand
AH/Protein:	spezifische Aktivität (spez. Akt.) der Anilin-p-hydroxylase, bezogen auf Leber-Protein, in nmol p-Aminophenol/mg Protein des "mikrosomalen" Überstandes/15 min Inkubation
Nettoinduktion:	Differenz der spez. Akt. (Bezug: "mikrosomales" Protein) zwischen NaCl und PB-Kontrollen
p-AP:	p-Aminophenol
Act D:	Actinomycin D
Ae:	Aethionin
Chi:	Cycloheximid
n:	Anzahl der Stichproben
x:	arithmetisches Mittel der Stichproben
s:	Standardabweichung von x
t ^x :	Testgröße
p:	Irrtumswahrscheinlichkeit
r:	Korrelationskoeffizient
a:	Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate
b:	Steigung der Regressionsgeraden
s:	Standardabweichung der Regressionsgeraden

Soweit bei den Abb. und Tab. n nicht angegeben ist, wurde gruppenweise (je 5 Tiere) aufgearbeitet.

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Mäuse 24 Std (Gabe von PB oder NaCl bzw. Futterentzug) oder 25 Std (zusätzliche Applikation von Hemmstoffen der Proteinsynthese, TEM oder GKB) nach Versuchsbeginn aufgearbeitet.

4.1.2. Präparation des "mikrosomalen" Überstandes

Überstände aus 20 min. Zentrifugation der Leberhomogenate bei Beschleunigungen von 5000 bis 21000 x g zeigten weder bei Bezug auf

Frischgewicht noch bei Bezug auf Protein unterschiedliche AH-Akt..

4.1.3. pH-Optimum

Unter den gewählten Versuchsbedingungen war die AH-Akt. bei einem pH-Wert von 7,8 bis 8,0 optimal (Abb. 2). Der pH-Wert veränderte sich während der Inkubation nicht.

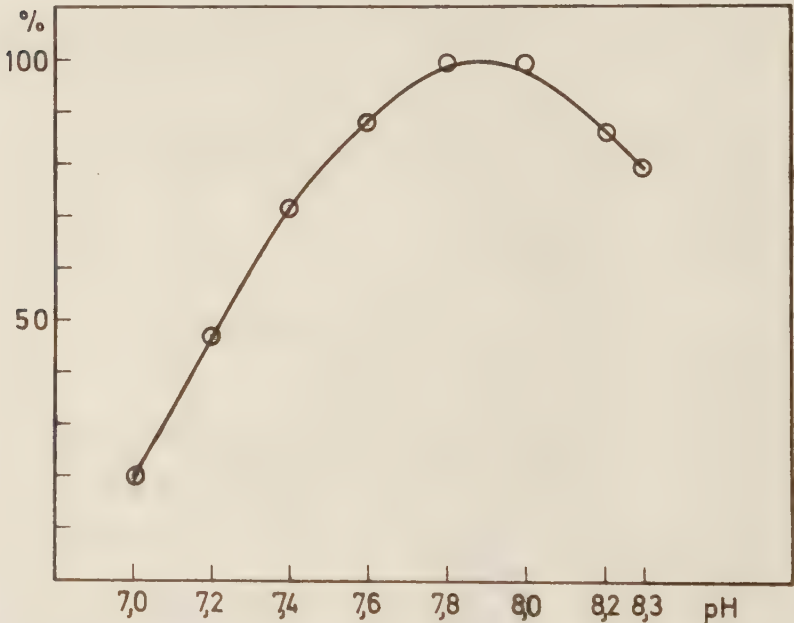


Abb. 2: Substratumsatz in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Abszisse: pH-Wert des Reaktionsmediums

Ordinate: AH-Akt. in Prozent des Maximums

4.1.4. Kofaktoren

Verdoppelung bzw. Halbierung der Konzentration der Kofaktoren

Nicotinamid, NADP^+ und Glucose-6-phosphat beeinflusste die AH-Akt.

nicht merklich (Abb. 3). Magnesiumchlorid-Konzentrationen von 2,5 bis 10 mmol/l Reaktionsmedium waren optimal, höhere hemmten die Enzymaktivität (Abb. 3).

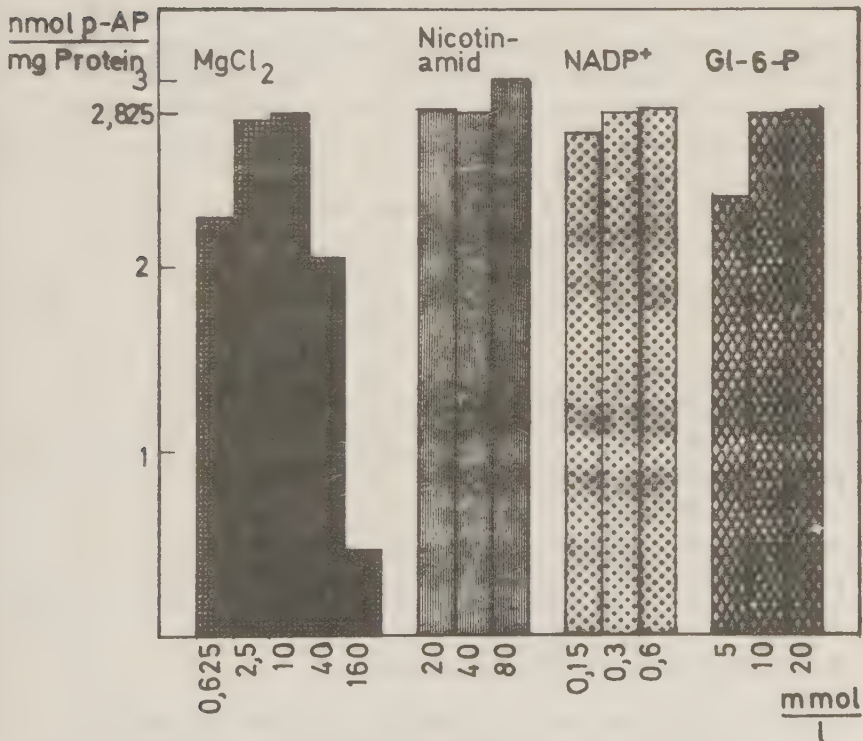


Abb. 3: Substratumsatz bei unterschiedlichen Kofaktoren-Konzentrationen.

Abszisse: Konzentration des jeweiligen Kofaktors in mmol/l Reaktionsmedium.

Ordinate: AH-Akt. in nmol p-AP/ml "mikrosomalem" Überstand

4.1.5. Substrat-Konzentration

Die gewählte Anilin-Konzentration lag weit im Sättigungsbereich. Selbst eine Verringerung auf 1/16 erniedrigte die Reaktionsgeschwindigkeit um weniger als 10 Prozent.

4.1.6. Haltbarkeit des "mikrosomalen" Überstandes

Die Enzymaktivität des "mikrosomalen" Überstandes fiel bei Raum- und Kühlschranktemperatur sehr schnell ab. Nach sofortigem Einfrieren blieb sie mindestens 24 Std unverändert erhalten (Tab. 1). Es wurden deshalb immer nur frisch gewonnene "mikrosomale" Überstände verwendet.

Tab. 1: Haltbarkeit des "mikrosomalen" Überstandes.

Alter und Aufbewahrungsart	AH-Aktivität in %
frisch	100
2 Std Kühlschrank	98
2 Std Raumtemperatur	92
24 Std Kühlschrank	81,5
24 Std eingefroren	100
22 Tage eingefroren	81,5
22 Tage eingefroren, dazwischen 2 x aufgetaut	62,5

4.1.7. Haltbarkeit des Reaktionsmediums

Das Kofaktoren-Substrat-Puffer-Gemisch war 3 Tage lang uneingeschränkt verwendbar. Ein merklicher Abfall der Wirksamkeit zeigte sich erst nach 17 Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank bzw. nach 7 Tagen bei Raumtemperatur (Tab. 2).

Tab. 2: Haltbarkeit des Reaktionsmediums.

Alter und Aufbewahrungsart	AH-Aktivität in %
frisch	100
1 Std Raumtemperatur	89,2
2 Std Raumtemperatur	88,3
72 Std Raumtemperatur	100,5
7 Tage Raumtemperatur	78
1 Std Kühlschrank	90
2 Std Kühlschrank	86,6
72 Std Kühlschrank	98,5
7 Tage Kühlschrank	89,7
17 Tage Kühlschrank	30,5

4.1.8. Inkubationszeit

Die p-AP-Ausbeute nahm zeitabhängig zu (Abb. 4). Der Anstieg ließ sich im untersuchten Bereich von 5 bis 60 Minuten als hochsignifikante Gerade darstellen ($p < 0,001$).

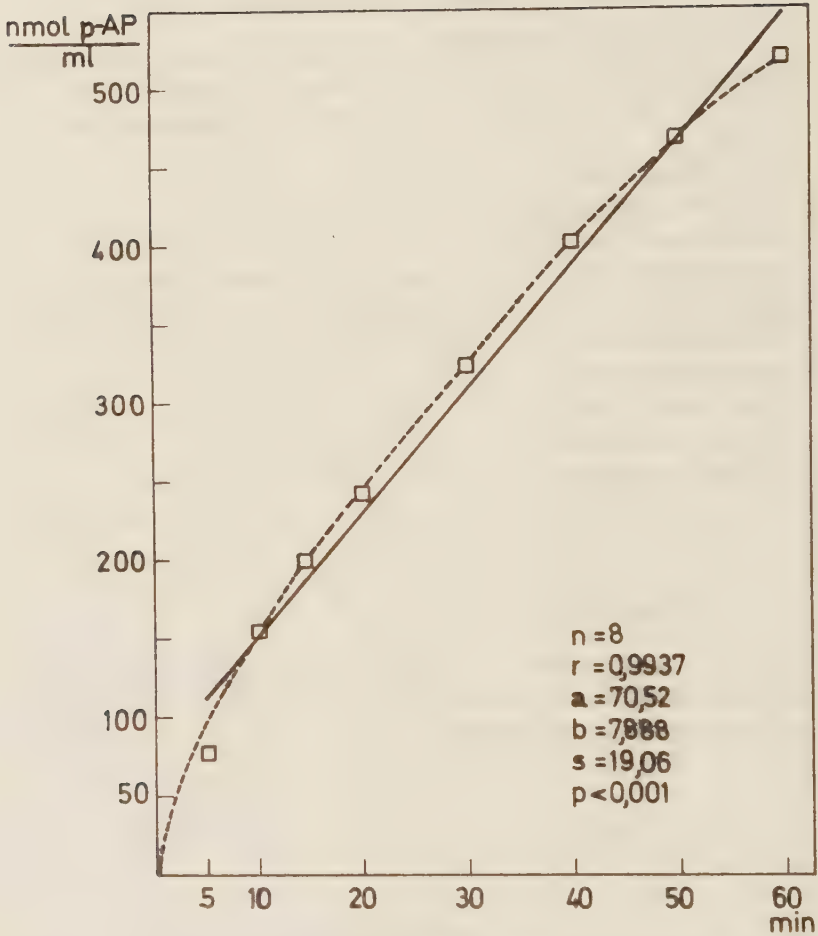


Abb. 4: p-Hydroxylierung von Anilin an Mikrosomen der Mäuseleber in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten

Ordinate: p-AP-Bildung in nmol/ml "mikrosomalem" Überstand

4.2. Die Indophenol-Farbreaktion

4.2.1. Tiefkühlung des Ätherextraktes

Die Tiefkühlung des Ätherextraktes blieb mindestens 24 Stunden lang ohne Einfluß auf die Indophenol-Farbreaktion. (Untersucht wurde nach 1 Std, 2 Std und 24 Std.)

4.2.2. Verlauf der Indophenol-Farbreaktion

Die Farbentwicklung stieg während eines Zeitraumes von 60 min an. Nach 90 min war eine geringgradige Entfärbung festzustellen (Abb. 5). Im Wertepaarvergleich lag der 60-Minuten-Wert signifikant ($p < 0,01$) über dem nach 30 Minuten gemessenen.

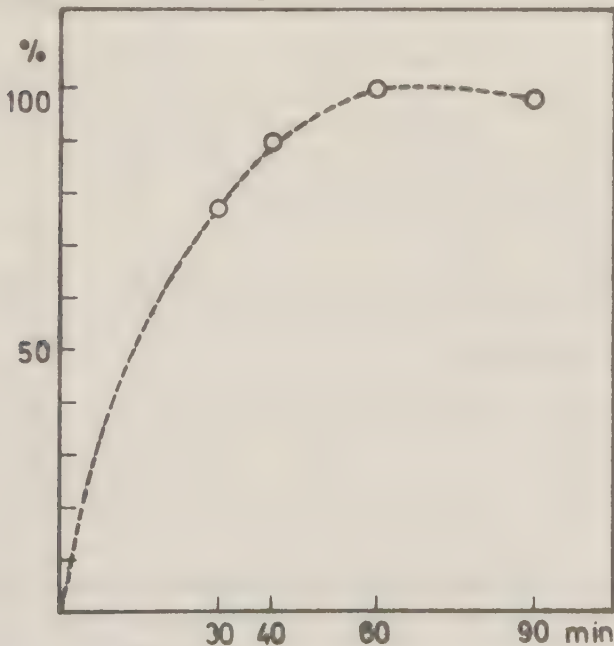


Abb. 5: Indophenol-Farbreaktion in Zeitabhängigkeit.
(n = 8 Bestimmungen je Meßpunkt)

Abszisse: Reaktionszeit in Minuten

Ordinate: Ausbeute in Prozent der Maximalreaktion

4. 3. Wirkung von Phenobarbital auf die Leber der Maus

4. 3. 1. Relatives Organgewicht

Ein Vergleich der PB-behandelten Tiere mit den NaCl-behandelten Kontrollen aus allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ergab eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Erhöhung des relativen Lebergewichtes um 11,4 Prozent 24 Std nach einmaliger Gabe von PB in einer Dosis von 100 mg/kg K. -Gew. (Tab. 5). 36 Std nach PB zeigte sich ein weiterer Anstieg des relativen Lebergewichtes, der gegenüber dem 24. std. PB-Wert ebenfalls signifikant ($p < 0,02$) war.

4. 3. 2. Proteinkonzentration des "mikrosomalen" Überstandes

8 Std nach PB-Gabe (100 mg/kg K. -Gew.) war die Proteinkonzentration des "mikrosomalen" Überstandes gegenüber jenem von Kontrollen signifikant ($p < 0,001$), nach 12 Std zwar geringer, jedoch ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) erhöht (Abb. 6). Nach 24 Std unterschied sich der Proteingehalt nicht mehr von dem der Kontrolle.

4. 3. 3. Aktivität der Anilin-p-hydroxylase

4. 3. 3. 1. Zeitabhängigkeit

Der 4 Std nach PB-Gabe (100 mg/kg K. -Gew.) einsetzende und nach 12 Std signifikante ($p < 0,05$) Anstieg der auf Gewichtseinheit Frischgewicht bezogenen Aktivität der AH (Abb. 7) dürfte auf die oben erwähnte Proteinbewegung zurückzuführen sein, da die spezifische Aktivität erst nach 16 Std signifikant ($p < 0,05$) anzusteigen begann (Abb. 8). Die Induktion der spezifischen Enzymaktivität durchlief nach etwa 48 Std ihr Maximum und war nach 72 Std noch nicht völlig abgeklungen (Abb. 9).

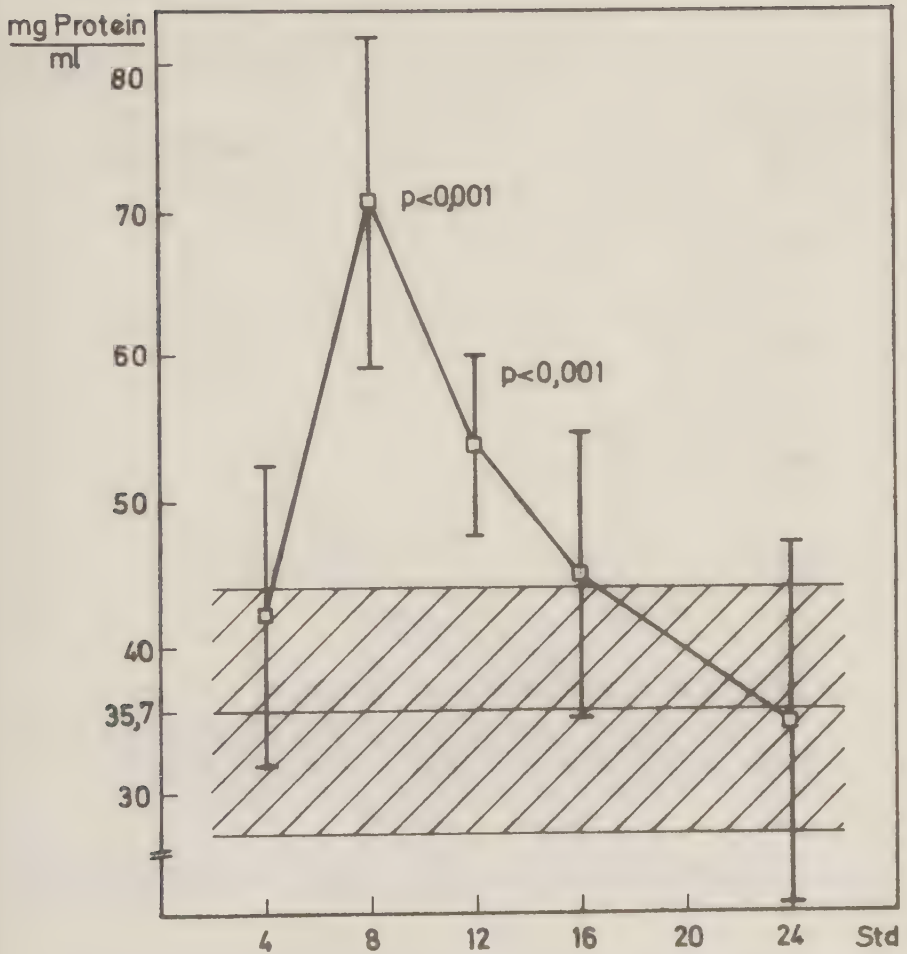


Abb. 6: "Mikrosomaler" Proteingehalt der Mäuseleber unter Einfluß von PB in Zeitabhängigkeit.

Abszisse: Zeitspanne zwischen PB-Gabe und Aufarbeitung in Stunden

Ordinate: mg Protein/ml "mikrosomalem" Überstand

///: NaCl-Kontroll-Durchschnitt mit Standardabweichung

n: 3 Tiere je Meßpunkt

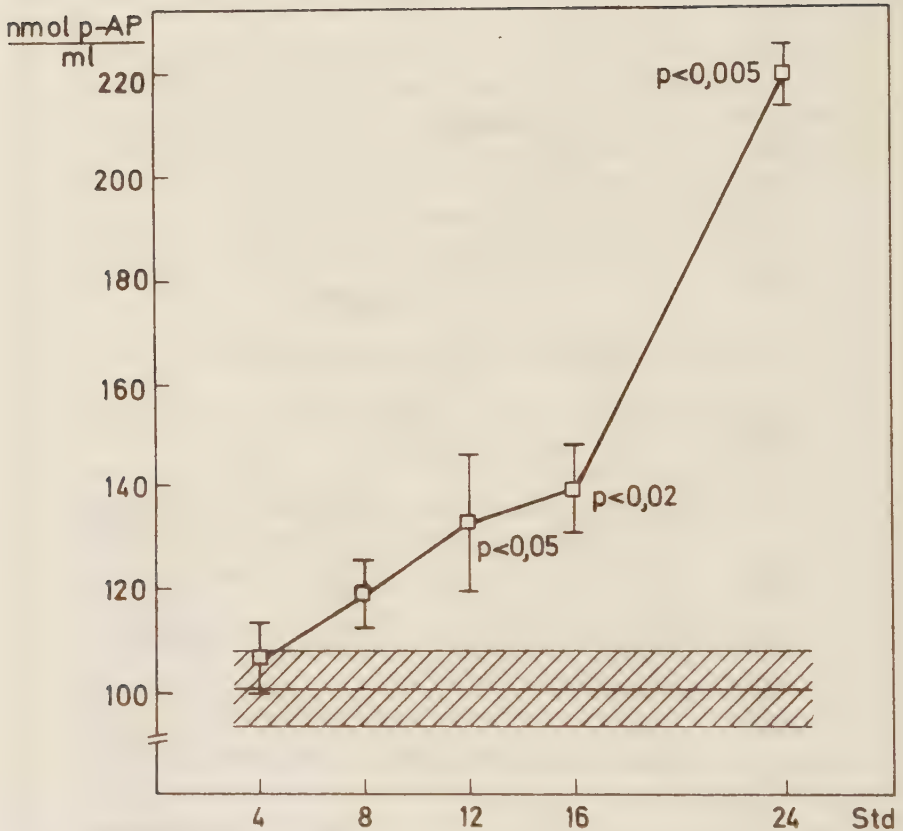


Abb. 7: Induktion der AH-Akt. der Mäuseleber durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) in Abhängigkeit von der Induktionszeit. Bezug: Volumen-Einheit des "mikrosomalen" Überstandes.

Abszisse: Zeit zwischen PB-Gabe und Aufarbeitung in Stunden

Ordinate: AH-Akt. in nmol p-AP/ml "mikrosomalem" Überstand/15 min

▨▨▨: NaCl-Kontroll-Durchschnitt mit Standardabweichung

n: 3 Tiere je Meßpunkt

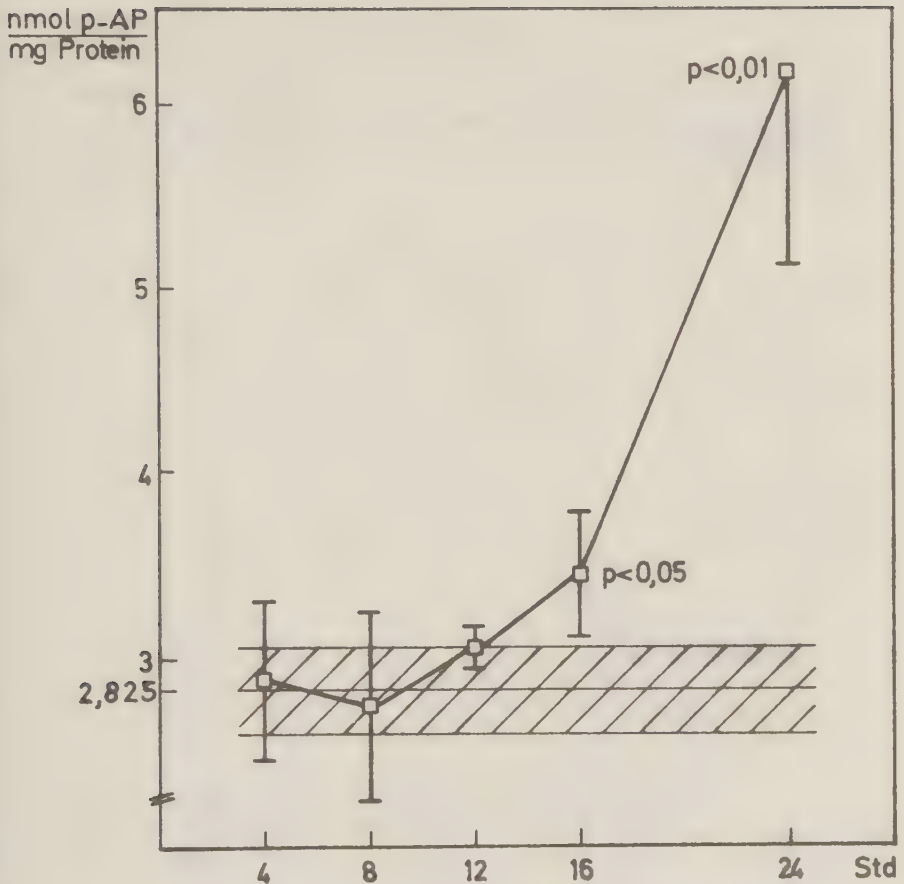


Abb. 8: Induktion der AH-Akt. der Mäuseleber durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) in Abhängigkeit von der Induktionszeit. Bezug: Gewichtsinheit des "mikrosomalen" Proteins.

Abszisse: Zeit zwischen PB-Gabe und Aufarbeitung in Stunden
Ordinate: AH-Akt. in nmol p-AP/mg Protein/15 min

▨: NaCl-Kontroll-Durchschnitt mit Standardabweichung
: 3 Tiere je Meßpunkt

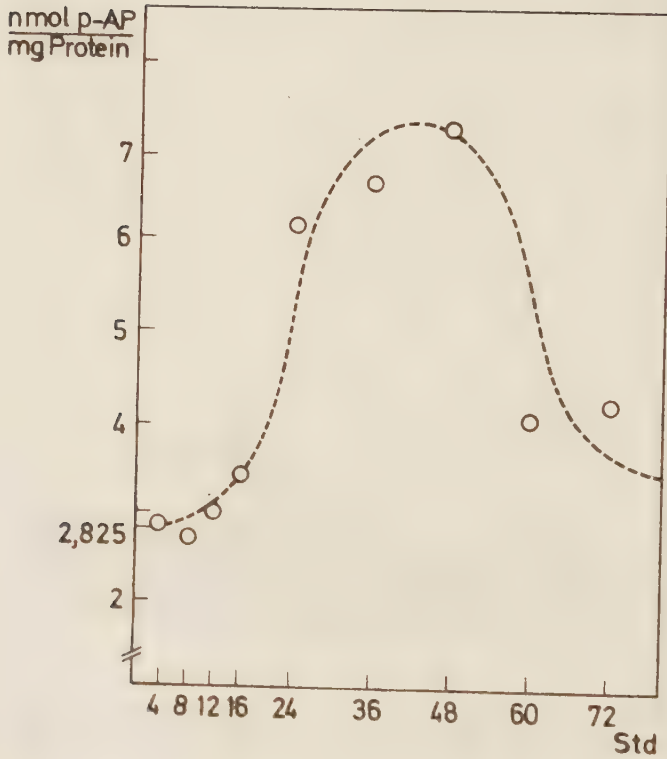


Abb. 9: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) in Abhängigkeit von der Induktionszeit. Bezug: Gewichtseinheit des "mikrosomalen" Proteins.

Abszisse: Zeit nach PB-Gabe in Stunden

Ordinate: AH-Akt. in nmol p-AP/mg Protein/15 min

4.3.3.2. Dosisabhängigkeit

Die Induktion der AH wurde 24 Std nach i.v. Injektion von 12,5, 25, 50 und 100 mg PB/kg K.-Gew. bestimmt. Es zeigte sich eine eindeutige Dosisabhängigkeit (Abb. 10), die im untersuchten Bereich bei Verwendung der reziproken Dosiswerte auch als hochsignifikante ($p < 0,01$) Gerade darstellbar ist.

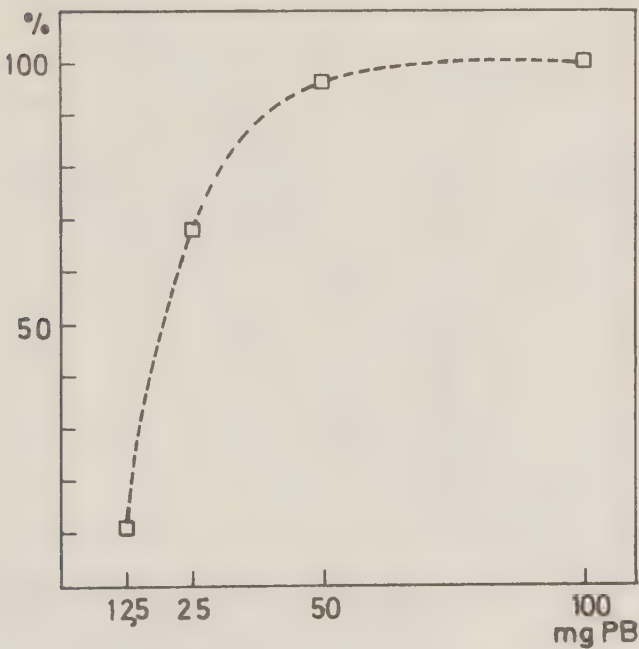


Abb. 10: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB in Abhängigkeit von der PB-Dosis. Aufarbeitungszeitpunkt: 24 Stunden nach i.v. Injektion von PB.

Abszisse: mg PB/kg K.-Gew.

Ordinate: Nettoinduktion der AH in Prozent des Maximums

4.3.3.3. Enzymkinetik

PB erhöhte sowohl die Michaeliskonstante (K_M) als auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{\max}$) der AH (Abb. 11, Tab. 9).

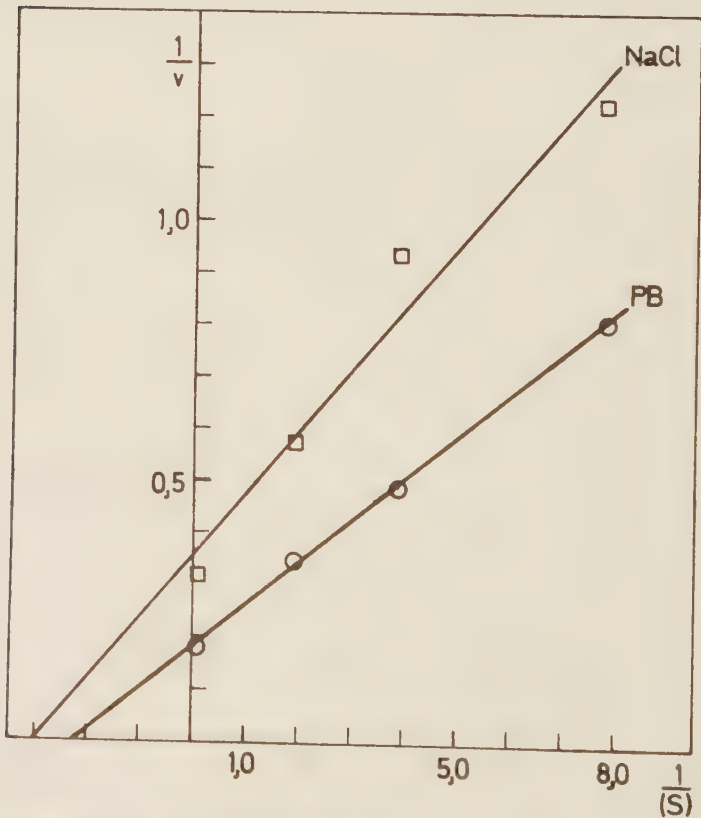


Abb. 11: Umsatz von Anilin an mikrosomaler AH der Mäuseleber in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Abszisse: reziproker Wert der Anilinkonzentration (in mmol/l Probevolumen)

Ordinate: reziproker Wert der Reaktionsgeschwindigkeit (Anilinumsatz in nmol/mg Protein/15 min)

4.4. Einfluß verschiedener Faktoren auf die Anilin-p-hydroxylase und ihre Induktion

4.4.1. Geschlecht

Hinsichtlich ihrer AH-Akt. unterschieden sich männliche und weibliche Kontrollmäuse (NaCl-Kontrollen) signifikant ($p < 0,05$), wobei die männlichen Tiere höhere Aktivität aufwiesen (Tab. 3). Bei mit PB behandelten Mäusen zeigte sich diesbezüglich kein Unterschied.

Tab. 3: Einfluß des Geschlechts auf die Anilin-p-hydroxylase in der Leber der Maus und ihre Induktion. (100 mg PB/kg K.-Gew.) Homogenat: 1 : 8 (G/V).

	AH/F.-Gew.				AH/Protein			
	NaCl		PB		NaCl		PB	
	männl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	weibl.	männl.	weibl.
$\bar{x}$	83,33	53,85	150,33	129,68	1,768	1,258	3,183	3,097
s_x	15,75	12,41	17,58	34,25	0,237	0,393	0,449	0,655
t	3,2850		1,1991		2,4776		0,2420	
p	<0,02		<0,30		<0,05		<0,90	
n	5	5	5	5	5	5	5	5

4.4.2. Tageszeit

Ein Einfluß der Tageszeit auf die AH-Akt. war nicht festzustellen. Untersucht wurden weibliche Mäuse 24 Std nach PB- bzw. NaCl-Gabe um 4⁰⁰, 8⁰⁰, 12⁰⁰, 16⁰⁰, 20⁰⁰ und 24⁰⁰ Uhr.

4.4.3. Haltungsbedingungen

24 std. Futterentzug erhöhte bei völlig unbehandelten weiblichen Mäusen die AH-Akt. signifikant ($p < 0,025$) (Tab. 4).

Tab. 4: Wirkung von 24 std. Futterentzug auf die Aktivität der Anilin-p-hydroxylase.

Futter	AH/F.-Gew.		AH/Protein	
	+	-	+	-
$\bar{x}$	66,70	108,30	1,97	2,80
$s_{\bar{x}}$	12,38	30,92	0,35	0,82
t	2,793		2,066	
p	< 0,025		< 0,10	
n	5	5	5	5

Sowohl 24 als auch 48 Std nach Futterentzug und gleichzeitiger PB-Gabe war eine zusätzliche Steigerung der induzierten AH-Akt. zu verzeichnen (Abb. 12).^{*} Die durch PB erhöhte K_M der AH (4.3.3.3.) wurde durch Futterentzug nicht weiter verändert, während V_{max} beträchtlich erhöht war (Tab. 9).

Wurden die Käfige zweimal täglich gereinigt, so zeigte sich nach einer Versuchsdauer von 48 Std bei hungernden Mäusen eine deutliche Erhöhung der AH-Akt. gegenüber Tieren, die in ungereinigten Käfigen gehalten wurden. Dieser Effekt war bei Haltung in Käfigen mit Einstreu im Vergleich zu solchen ohne Einstreu deutlich stärker (Abb. 13).

^{*} Die stimulierende Wirkung von Futterentzug auf die AH-Akt. konnte auch in anderen Versuchen (Abb. 14, Abb. 25) bestätigt werden.

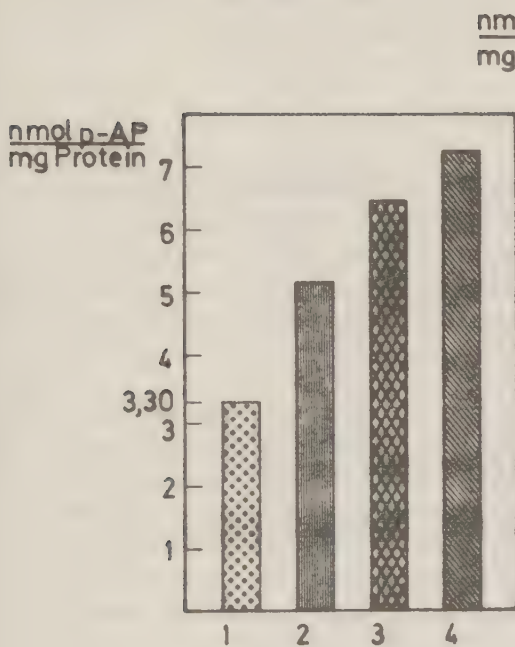


Abb. 12

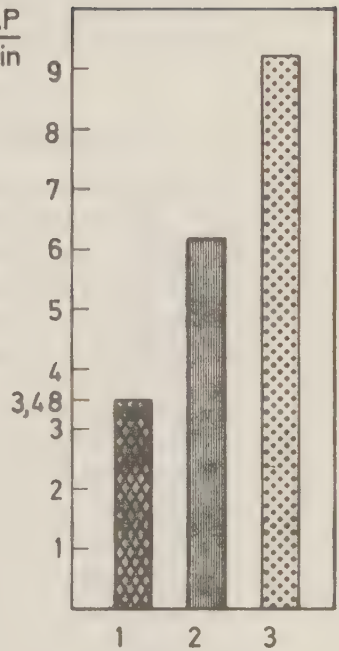


Abb. 13

Abb. 12: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) nach Futterentzug.

Säulen: 1. PB + Futter, Aufarbeitung nach 24 Stunden
2. PB + Futter, Aufarbeitung nach 48 Stunden
3. PB + Futterentzug, Aufarbeitung nach 24 Stunden
4. PB + Futterentzug, Aufarbeitung nach 48 Stunden

Ordinate: Nettoinduktion der AH in nmol p-AP/mg Protein/15 min

Abb. 13: AH-Akt. in der Leber von Mäusen nach Futterentzug unter dem Einfluß verschiedener Haltungsbedingungen. Aufarbeitung nach 48 Stunden.

Säulen: 1. Futterentzug + Einstreu ohne Reinigung
2. Futterentzug ohne Einstreu + Reinigen der Käfige (zweimal täglich)
3. Futterentzug + Einstreu + Reinigen der Käfige (zweimal täglich Wechsel der Einstreu)

Ordinate: AH-Akt. in nmol p-AP/mg Protein/15 min

Weder Futter noch Einstreu enthielten gaschromatographisch nachweisbare Konzentrationen an polychlorierten Biphenylen, Hexachlorbenzol und DDT. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 ppm.*

4.5. Kontrollwerte

Die im Rahmen der Untersuchungen zur Beeinflussung der AH-Akt. und ihrer Induktion an weiblichen Mäusen ermittelten Kontrollwerte für Körper- und Lebergewicht, AH-Akt. und Proteingehalt der Leber sind in Tab. 5 zusammengestellt. Die Versuchsgruppen wurden selbstverständlich unter zeitlich und methodisch identischen Bedingungen wie die Kontrollgruppen gehalten und verwendet.

Bei der tabellarischen oder graphischen Darstellung der einzelnen Versuche wurde stets der Wert der jeweiligen NaCl-Kontrollen von den übrigen Werten abgezogen. Der so als Differenz zwischen NaCl-Kontrolle und PB-Kontrolle erhaltene Nettoinduktionswert wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Er entsprach einem Umsatz von 118,330 nmol/ml "mikrosomalem" Überstand bzw. 3,30 nmol/mg Protein des Überstandes und ergab die Berechnungsgrundlage aller anderen Versuchswerte.

Bei Versuchen ohne PB-Induktion wurde der NaCl-Kontrollwert gleich 100 Prozent gesetzt. Er entsprach einem Substratumsatz von 101,08 nmol/ml "mikrosomalem" Überstand bzw. 2,825 nmol/mg Protein des Überstandes (Tab. 5).

* Für die gaschromatographischen Untersuchungen von Futter und Einstreu möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. ELMAR RICHTER herzlich danken.

Tab. 5: Kontrollwerte

	K. -Gew.		a. L. -Gew.		r. L. -Gew.		Protein		AH/F. -Gew.		AH/Protein	
	NaCl	PB	NaCl	PB	NaCl	PB	NaCl	PB	NaCl	PB	NaCl	PB
$\bar{x}$	21,91	21,12	1,278	1,402	5,853	6,644	35,70	35,78	101,08	219,4	2,825	6,125
$S^2_{\bar{x}}$	2,27	1,88	0,190	0,188	0,725	0,683	5,90	5,68	30,0	69,4	0,993	2,835
t	3,3464		5,7593		9,8593		0,0666		10,7669		7,3670	
p	<0,001		<0,001		<0,001		<0,9		<0,001		<0,001	
* n	126	192	126	192	126	192	43	42	46	58	43	42

* n: Für K. -Gew., a. L. -Gew. und r. L. -Gew.: Anzahl der Mäuse.

Für Protein, AH/F. -Gew. und AH/Protein: Anzahl der Versuchsgruppen.

Sie bestanden aus jeweils 5 Mäusen, die zusammen aufgearbeitet wurden.

4.6. Einfluß von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung auf die Anilin-p-hydroxylase und ihre Induktion

4.6.1. Dosisabhängigkeit

In einem Dosisbereich von 204 bis 816 rd hemmte Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB) 1 Std vor PB-Gabe die Induktion der AH, während nach 102 rd der Induktionsvorgang unter den gleichen Bedingungen eher noch gefördert wurde. Die Hemmwirkung konnte statistisch nicht gesichert werden.

4.6.2. Bestrahlungszeitpunkt

Wurde 4, 8, 12 oder 16 Std vor PB-Gabe bestrahlt (408 rd), zeigte sich in jedem Fall eine deutliche (bei GKB 8 Std vor PB signifikante) Verstärkung der Induktion (Abb. 14, Tab. 6).

Tab. 6: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) 8 Std nach GKB mit 408 rd.
Aufarbeitung 24 Std nach PB-Applikation.

	AH/Protein		
	GKB	PB	GKB+PB
$\bar{x}$	1,7380	4,1840	5,4520
$s_{\bar{x}}$	0,3956	0,7132	0,4540
t	6,7050		3,3536
p	< 0,001		< 0,01
n	5	5	5

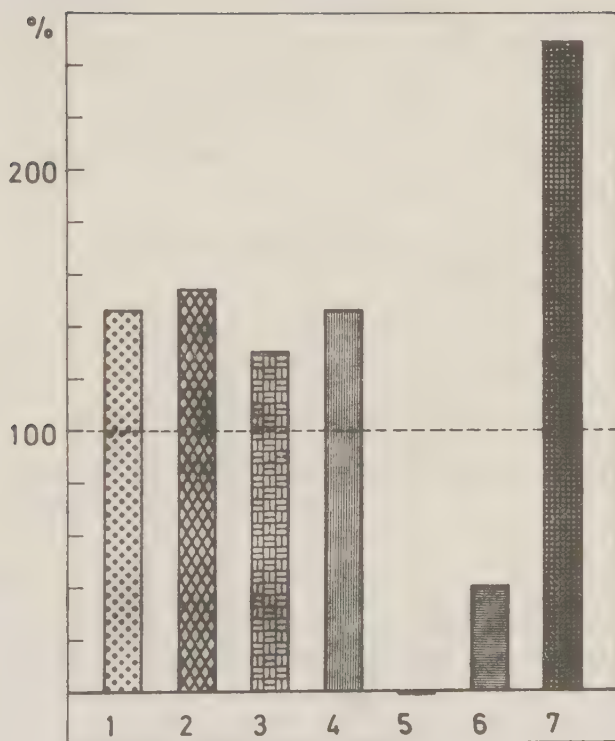


Abb. 14:

Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) nach GKB (408 rd) in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt. Aufarbeitung 24 Std nach PB-Applikation.

Säulen:

1. Zeit zwischen GKB und PB-Gabe 4 Std
2. Zeit zwischen GKB und PB-Gabe 8 Std
3. Zeit zwischen GKB und PB-Gabe 12 Std
4. Zeit zwischen GKB und PB-Gabe 16 Std
5. GKB ohne PB (Aufarbeitung 32 Std nach GKB)
6. 8 Std nach GKB: Futterentzug (" " ")
7. 8 Std nach GKB: PB + Futterentzug

Ordinate:

Nettoinduktion der AH in Prozent der PB-Kontrolle

4.6.3. Wiederholte GKB

Auch wiederholte GKB (4 x 51 bzw. 102 rd in 24 std. Abstand) förderte die PB-Induktion (100 mg/kg K.-Gew. 1 Std nach letzter GKB) (Abb. 15, Tab. 7).

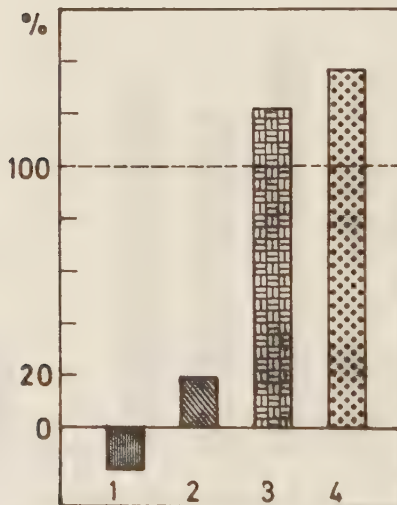


Abb. 15: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) 1 Std nach der letzten von 4 jeweils im Abstand von 24 Std wiederholten GKB mit Dosen entsprechend 51 bzw. 102 rd. Aufarbeitung 24 Std nach PB-Gabe.

Säulen:

1. 4 x 51 rd ohne PB
2. 4 x 102 rd ohne PB
3. 4 x 51 rd + PB
4. 4 x 102 rd + PB

Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

Tab. 7: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K. -Gew.) 1 Std nach der letzten von 4 jeweils im Abstand von 24 Std wiederholten GKB mit 102 rd. Aufarbeitung 24 Std nach PB-Gabe.

	AH/F. -Gew.		AH/Protein	
	PB	GKB+PB	PB	GKB+PB
$\bar{x}$	170,0	257,5	4,071	4,813
$s_{\bar{x}}$	39,5	61,4	1,105	1,728
t	2,5005		0,75523	
p	<0,05		<0,50	
n	5	3	5	3

4.7. Einfluß von 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin auf die Anilin-p-hydroxylase und ihre Induktion

4.7.1. Dosisabhängigkeit

2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin (TEM) hatte nur in der höchsten verwendeten Dosis von 40 mg/kg K. -Gew. eine hemmende Wirkung auf die nach 1 Std folgende PB-Induktion der AH, während kleinere Dosen (am deutlichsten die kleinste verwendete Dosis von 5 mg TEM/kg K. -Gew.) eine Verstärkung der Induktion bewirkten (Abb. 16). In ähnlicher Weise beeinflusste TEM auch die nichtinduzierte AH-Akt. (Abb. 17).

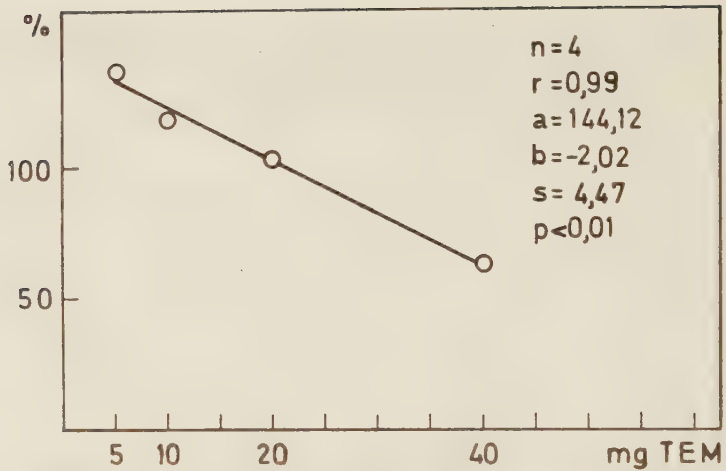


Abb. 16: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K. -Gew.) unter dem Einfluß von TEM in Dosisabhängigkeit.

Abszisse: mg TEM/kg K. -Gew.

Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

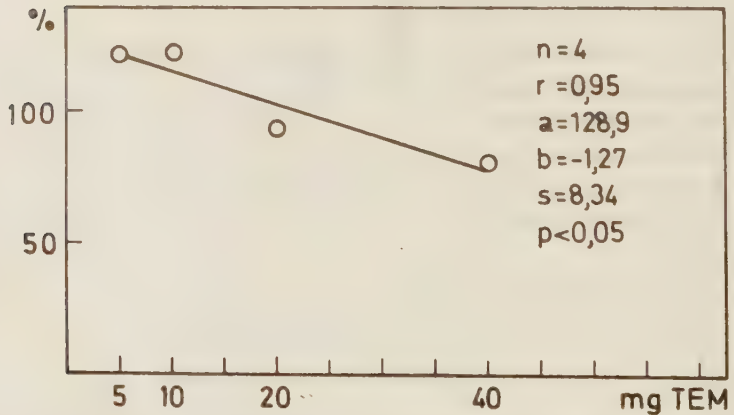


Abb. 17: Wirkung von TEM auf die nichtinduzierte AH-Akt. in Dosisabhängigkeit.

Abszisse: mg TEM/kg K. -Gew.

Ordinate: Spez. Akt. in Prozent der NaCl-Kontrollen

4.7.2. Applikationszeitpunkt

Im untersuchten Zeitraum von 1 bis 24 Std konnte eine Hemmwirkung nur bei Gabe von TEM 1 Std vor PB gezeigt werden. Wurde PB 8 Std nach TEM appliziert, so war keine Beeinflussung der Induktion festzustellen, während bei Gabe 16 bzw. 24 Std nach TEM eine deutliche Stimulierung der AH-Induktion erfolgte (Abb. 18).

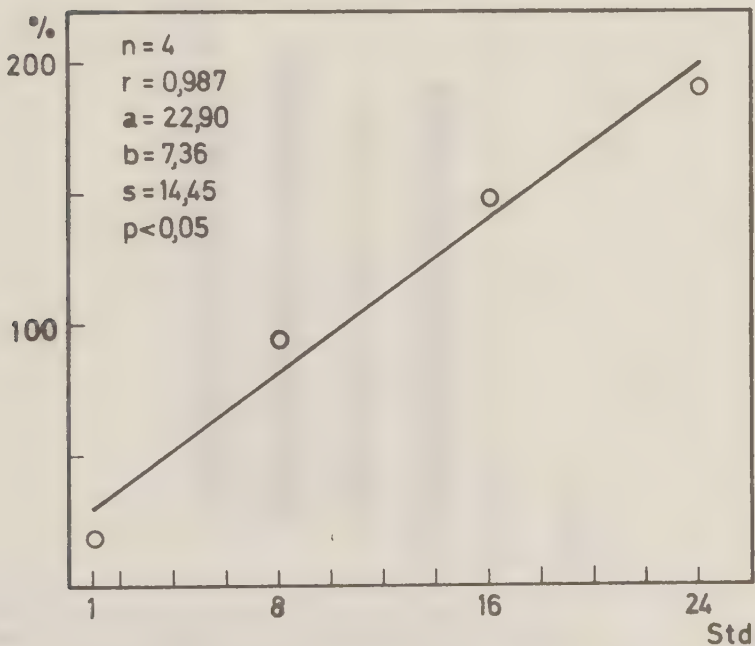


Abb. 18: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) nach Gabe von TEM in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt.

Aufarbeitung 24 Stunden nach PB-Gabe.

Abszisse: Zeit zwischen der Applikation von TEM und PB in Stunden
Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

4.7.3. Wiederholte Gabe kleiner Dosen

Die wiederholte Gabe kleiner Dosen TEM (4 x in 24 std. Abstand, PB 1 Std nach der letzten TEM-Gabe) förderte den Induktionsvorgang deutlich, wobei aber im untersuchten Bereich von 0,25 bis 2,0 mg/kg K.-Gew. keine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen war (Abb. 19). Unter den gleichen Bedingungen hatte 4malige Gabe von TEM (0,25, 0,5 und 1,0 mg/kg K.-Gew.) ohne nachfolgende PB-Induktion keinen Einfluß auf die AH-Akt. .

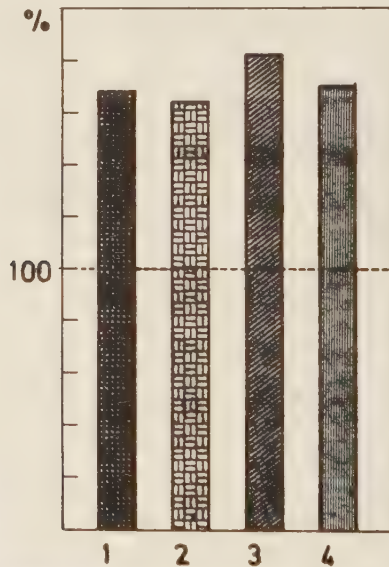


Abb. 19:

Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) 1 Std nach der letzten von 4 im Abstand von jeweils 24 Std erfolgten i. v. Injektionen von TEM. Aufarbeitung 24 Std nach Gabe von PB.

Säulen:

1. 4 x 0,25 mg TEM/kg K.-Gew.
2. 4 x 0,5 mg TEM/kg K.-Gew.
3. 4 x 1,0 mg TEM/kg K.-Gew.
4. 4 x 2,0 mg TEM/kg K.-Gew.

Ordinate:

Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

4.8. Einfluß von Hemmstoffen der Proteinsynthese auf die Anilin-p-hydroxylase und ihre Induktion

4.8.1. Aethionin

Am Beispiel des Aethionins wurde der Zeitpunkt stärkster Hemmbarkeit der Induktion der AH bestimmt. Maximale Hemmbarkeit war gegeben, wenn Aethionin 1 Std vor PB verabreicht wurde (Abb. 20). In der Folge wurde dieser Zeitfaktor bei fast allen Versuchen mit Hemmstoffen der Proteinsynthese beibehalten.

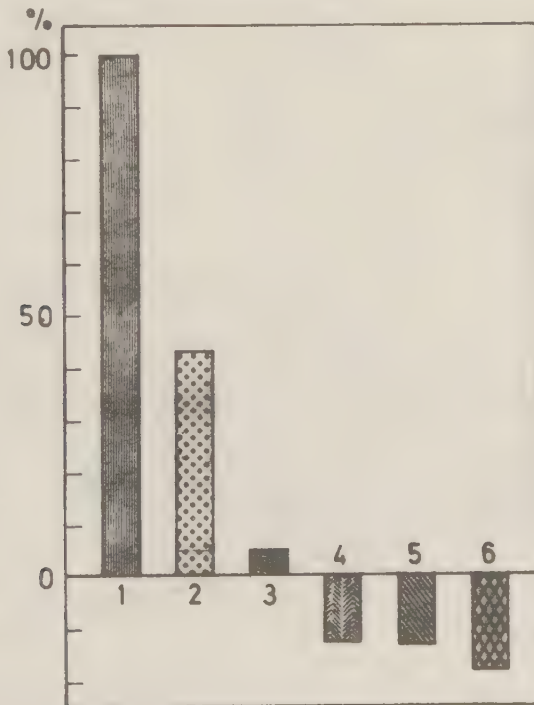


Abb. 20: Induktion der AH in der Leber der Maus unter dem Einfluß von Aethionin (200 mg/kg K.-Gew.) in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt.

- Säulen:
1. PB-Kontrolle (100 mg/kg K.-Gew.)
 2. Aethionin, 60 min nach PB
 3. Aethionin, gleichzeitig mit PB
 4. Aethionin, 30 min vor PB
 5. Aethionin, 60 min vor PB
 6. Aethionin, ohne PB

Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

Die Hemmung der Induktion durch Aethionin (Tab. 8) war deutlich dosisabhängig (Abb. 21). Bei einer Dosis von 50 mg/kg K. -Gew. war die Induktion der AH durch PB aufgehoben. Höhere Aethionin-Gaben (bis 400 mg/kg K. -Gew.) verminderten den Substratumsatz auf ein Niveau, das unter dem der normalen (= NaCl-Kontrollen) Mäuse lag. Dagegen bewirkten 50 mg Aethionin/kg K. -Gew. ohne nachfolgende PB-Gabe keine Verminderung der AH-Akt..

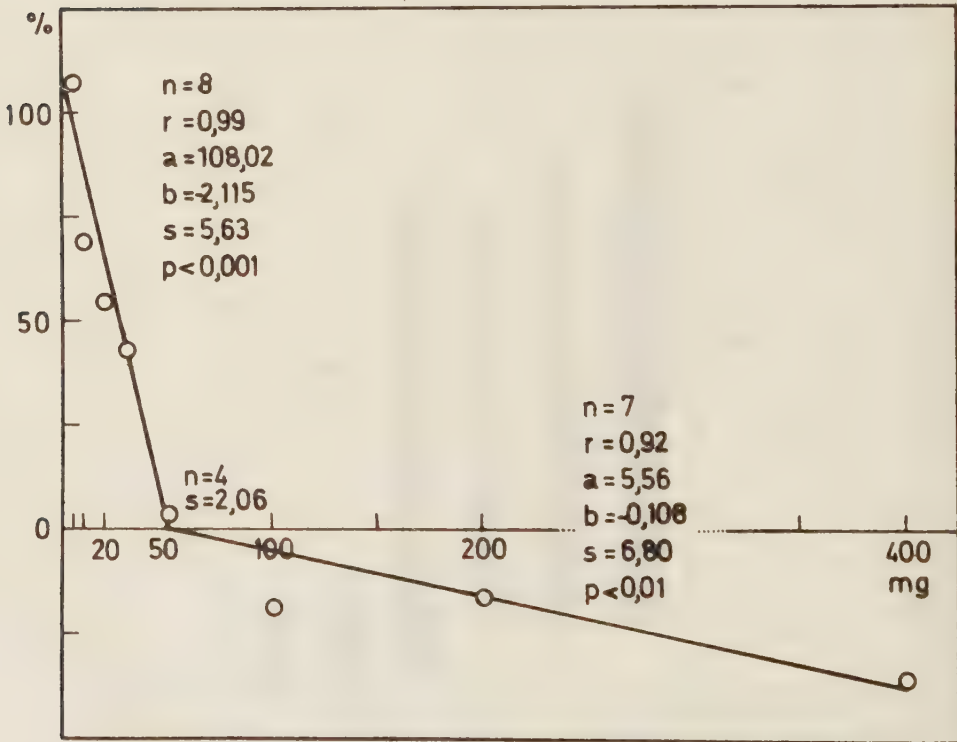


Abb. 21: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K. -Gew.) unter dem Einfluß von Aethionin in Dosisabhängigkeit.

Abszisse: mg Aethionin/kg K. -Gew.
Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

Tab. 8: AH-Induktion durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) unter dem Einfluß von Aethionin (Ae, 200 mg/kg K.-Gew.)

	AH/Protein	
	PB	Ae+PB
$\bar{x}$	3,183	1,526
$s_{\bar{x}}$	0,449	0,211
t	7,464	
p	< 0,001	
n	5	5

4.8.2. Cycloheximid

4.8.2.1. Anilin-p-hydroxylase-Aktivität

Cycloheximid (Chi) hemmte die PB-Induktion der AH deutlich dosisabhängig (Abb. 22), aber erst die relativ hohe Dosis von 100 mg/kg K.-Gew. hob die Induktion völlig auf. Die nicht-induzierte AH wurde durch die gleiche Dosis nur unwesentlich beeinflußt.

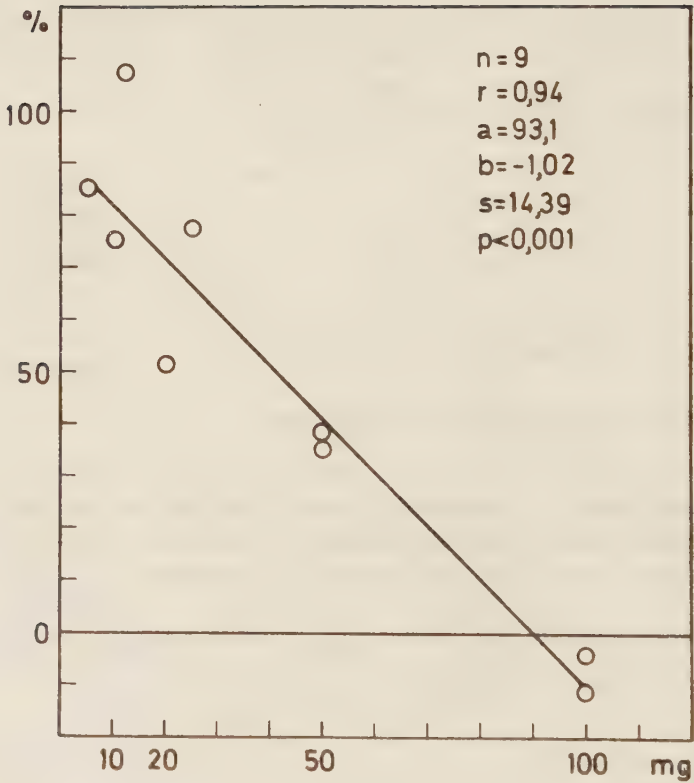


Abb. 22:

Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.) unter dem Einfluß von Cycloheximid in Dosisabhängigkeit.

Abszisse:

mg Cycloheximid/kg K.-Gew.

Ordinate:

Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

4.8.2.2. Cytochrom P-450-Gehalt

Durch Verabreichung von 100 mg PB/kg K. -Gew. ließ sich der Cyt P-450-Gehalt innerhalb von 24 Std mehr als verdoppeln. Diese PB-Induktion von Cyt P-450 war durch Chi (100 mg/kg K. -Gew., 1 Std vor PB) hemmbar (Abb. 23).

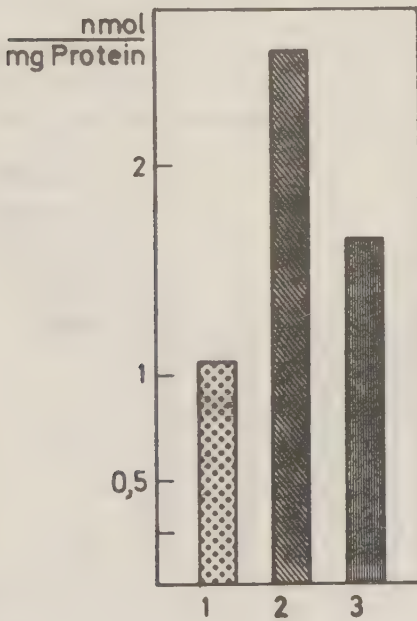


Abb. 23: Cytochrom P-450-Gehalt von Mikrosomen-Präparationen der Mäuseleber unter dem Einfluß von PB (100 mg/kg K. -Gew.) bzw. PB und Cycloheximid (100 mg/kg K. -Gew., 1 Std vor PB).

Säulen: 1. NaCl-Kontrollen
2. PB
3. Chi + PB

Ordinaten nmol Cyt P-450/mg mikrosomalem Protein

4.8.3. Actinomycin D

4.8.3.1. Dosisabhängigkeit

Die Induktion der AH durch PB (100 mg/kg K. -Gew.) hemmte Actinomycin D (Act D) in Dosen von 0,4 bis 1,2 mg/kg K. -Gew., während es in Dosen von 0,1 bis 0,3 mg/kg K. -Gew. die Induktion förderte (Abb. 24).

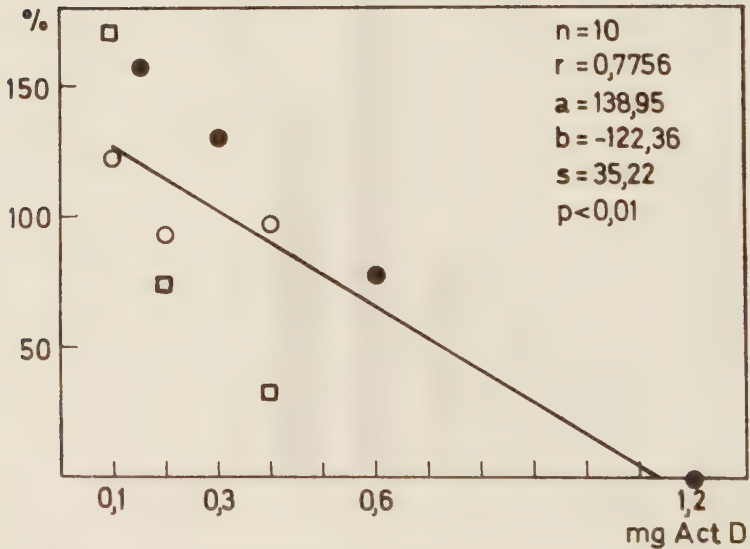


Abb. 24: Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K. -Gew.) unter dem Einfluß von Actinomycin D in Dosisabhängigkeit.

Abszisse: mg Act D/kg K. -Gew.

Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

□ ● ○ : verschiedene Versuchsreihen

4.8.3.2. Wiederholte Gabe kleiner Dosen

Wurden sehr kleine Dosen Act D (37,5 bzw. 75 µg/kg K.-Gew.) insgesamt 4 x in 24 std. Abstand verabreicht, so war die 1 Std nach der letzten Act D-Gabe durch PB erzeugte Induktion der AH deutlich höher als bei den Kontrollen (um 30 bzw. 48 Prozent). Die gleiche Act D-Behandlung ohne PB-Induktion hatte keinen Einfluß auf die AH-Akt..

4.8.3.3. Ohne Induktion

Gabe von Act D ohne nachfolgende PB-Induktion hatte nur eine geringe Wirkung auf die AH-Akt.. Es deutete sich eine Dosisabhängigkeit an (Abb. 25).

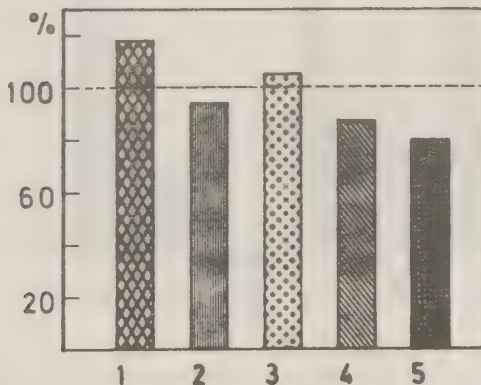


Abb. 25: AH-Akt. in der nicht-induzierten Leber der Maus unter dem Einfluß von Actinomycin D.

Säulen: 1. 37,5 µg Act D/kg K.-Gew.
2. 75 " " " " "
3. 150 " " " " "
4. 300 " " " " "
5. 600 " " " " "

Ordinate: Spez. Akt. in Prozent der NaCl-Kontrolle

4.8.3.4. 48 Std nach PB-Gabe

Wenn Act D erst 48 Std nach PB verabreicht wurde, förderte es sogar noch in der relativ hohen Dosierung von 0,6 mg/kg K.-Gew. den Induktionsvorgang (Abb. 26).

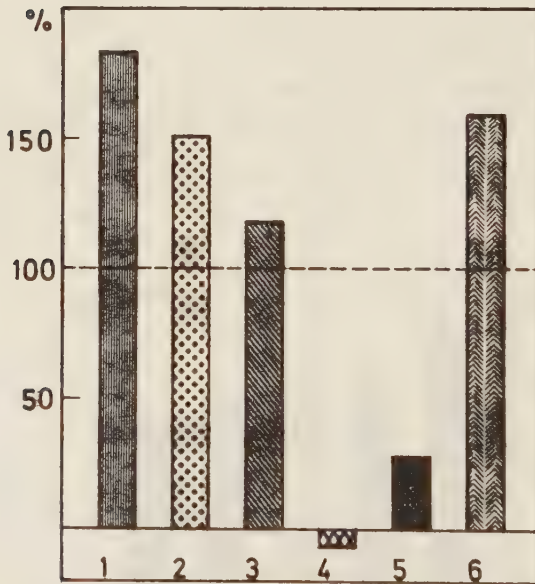


Abb. 26: Wirkung von Actinomycin D auf die AH-Akt. 48 Stunden nach Induktion durch PB (100 mg/kg K.-Gew.). Aufarbeitung 24 Stunden nach Act D-Gabe bzw. Futterentzug.

Säulen: 1. 0,15 mg Act D/kg K.-Gew. + PB
2. 0,3 " " " " " + PB
3. 0,6 " " " " " + PB
4. 0,6 " " " " " ohne PB
5. 0,6 " " " " " ohne PB + Futterentzug
6. PB + Futterentzug

Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

4.8.3.5. Beeinflussung der AH-Kinetik

Die durch PB erhöhte K_M der AH (4.3.3.3.) wurde durch Act D-Gabe 48 Std nach PB nicht weiter verändert, während V_{max} fast verdoppelt wurde (Abb. 27, Tab. 9).

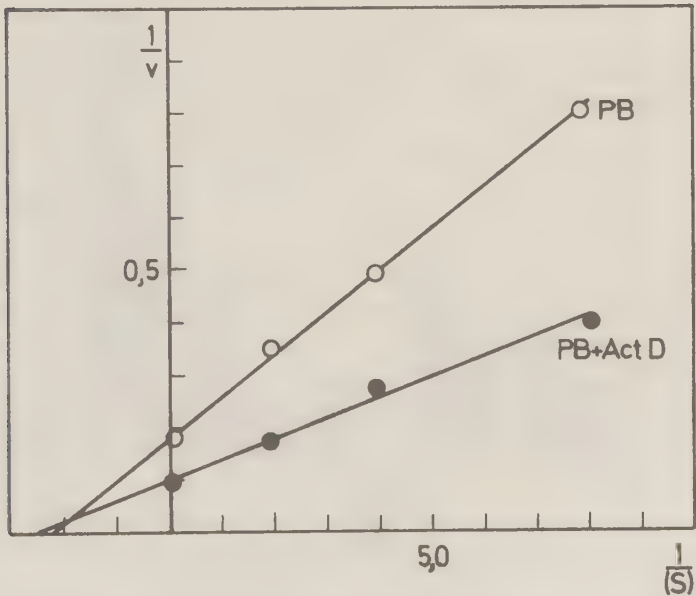


Abb. 27: p-Hydroxylierung von Anilin an Mikrosomen der durch PB (100 mg/kg K. -Gew.) induzierten Mäuselebern unter dem Einfluß von Actinomycin D (0,15 mg/kg K. -Gew.) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Darstellung nach LINEWEAVER und BURK (228).

Abszisse: Reziproker Wert der Substrat- (= Anilin-)Konzentration in mmol/l

Ordinate: Reziproker Wert des Umsatzes von Anilin in nmol/mg Protein/15 min

Tab. 9: p-Hydroxylierung von Anilin an Mikrosomen-Präparationen der Mäuseleber in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration.
Darstellung nach LINEWEAVER und BURK.
Aufarbeitung der Tiere 72 Std nach Versuchsbeginn. Futterentzug oder Gabe von Act D erfolgten 24 Std vor Aufarbeitung.

K_M : Michaeliskonstante in $\text{mol/l} \times 10^{-5}$

V_{max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit in $\text{nmol p-AP/mg Protein/15 min}$

	NaCl	PB				
		allein	+ Futterentzug	+ Actinomycin D		
				0,6 mg	0,3 mg	0,15 mg
n	4	4	4	4	4	4
r	0,9782	0,9995	0,9970	0,9997	0,9962	0,9944
a	0,3552	0,1997	0,1210	0,1187	0,1175	0,0999
b	0,1183	0,0804	0,0498	0,0518	0,0459	0,0397
s	0,1011	0,0096	0,0156	0,0048	0,0161	0,0170
p	<0,025	<0,001	<0,004	<0,001	<0,004	<0,006
K_M	33,3	44,8	41,1	43,65	39,15	39,75
V_{max}	2,815	5,56	8,28	8,40	8,55	10,0

4.8.4. Kombinationswirkungen

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Induktionsvorgang der AH durch PB verhielten sich Aethionin und Act D bzw. Aethionin und Cycloheximid bei gleichzeitiger Gabe 1 Std vor PB summativ (Abb. 28).

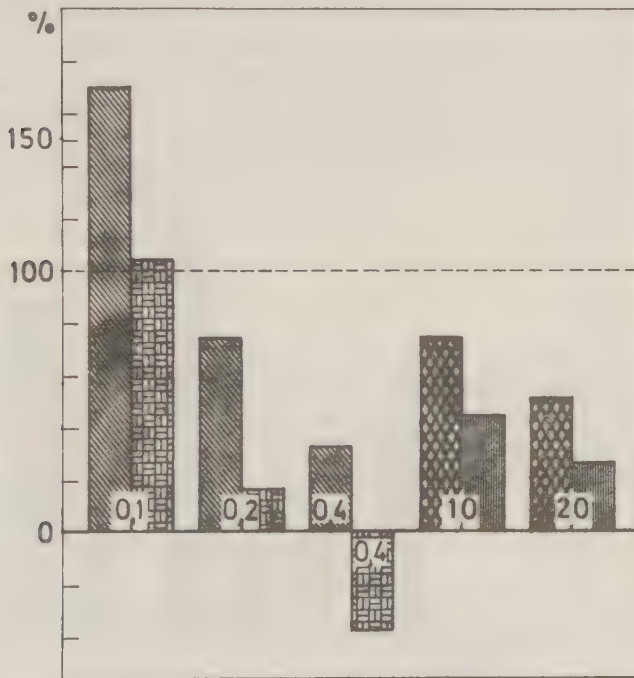


Abb. 28: Kombinationswirkungen von Hemmstoffen der Proteinsynthese auf die Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB (100 mg/kg K.-Gew.).

Säulen: Act D + PB
 Act D + PB + 50 mg Aethionin/kg K.-Gew.
 Cyclo + PB
 Cyclo + PB + 50 mg Aethionin/kg K.-Gew.

Die Dosen von Act D bzw. Cyclo sind in mg/kg K.-Gew. in den Säulenpaaren angegeben.

Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der PB-Kontrolle

4.8.5. Wirkung von Hemmstoffen der Proteinsynthese auf den Verlauf der Induktion

Aethionin und Cycloheximid (Gabe jeweils 1 Std vor PB) hatten nach 36 Std in Dosen, die die 24 Std-Induktion völlig hemmten, noch eine starke Hemmwirkung auf den Induktionsvorgang, während Actinomycin D in einer Dosis, die die 24 Std-Induktion deutlich hemmte, nach 36 Std eine starke Förderung des Induktionsvorganges bewirkte (Abb. 29). Nach 48 Std (dem Maximum der Induktion der AH durch 100 mg PB/kg K. -Gew.) war bei allen drei untersuchten Hemmstoffen keine nennenswerte Wirkung mehr festzustellen.

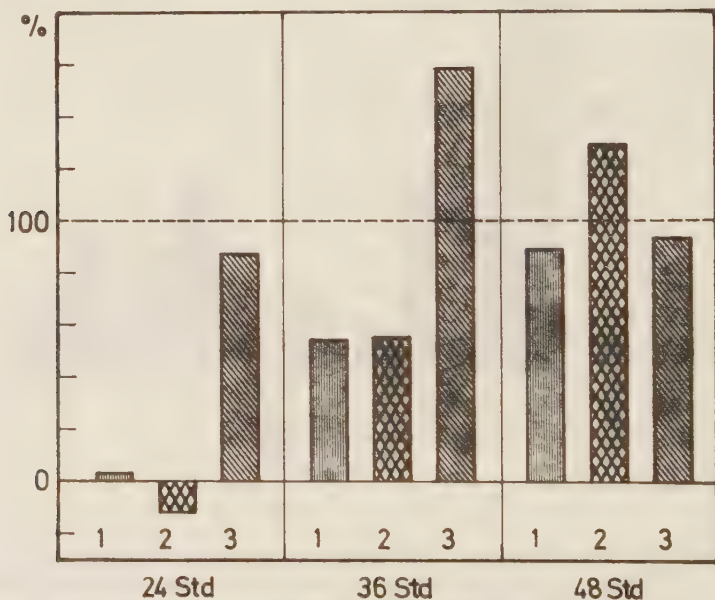


Abb. 29: Wirkung von Hemmstoffen der Proteinsynthese auf den Verlauf der Induktion der AH durch PB (100 mg/kg K. -Gew.). Gabe der Hemmstoffe jeweils 1 Std vor PB. Aufarbeitung 24, 36 und 48 Std nach PB-Gabe.

Säulen: 1. 50 mg Aethionin/kg K. -Gew.
 2. 100 mg Cyclo/kg K. -Gew.
 3. 0,6 mg Act D/kg K. -Gew.

Ordinate: Nettoinduktion in Prozent der jeweiligen (24, 36 und 48 Std) PB-Kontrolle

5. DISKUSSION

5.1. Zu den Vorversuchen

5.1.1. Reaktionsbedingungen der Anilin-p-hydroxylase in vitro

Der vorliegend für die Aktivität der AH der Maus in Tris-Puffer als optimal ermittelte pH-Bereich von 7,8 bis 8,0 erscheint gegenüber den für Ratten bei Verwendung von Phosphat-Puffer angegebenen pH-Optima von 7,0 (39) bzw. 7,4 (158, 183) relativ hoch. Die unterschiedlichen Reaktionsmaxima dürften weniger speciesabhängig, als pufferspezifisch sein: Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hexobarbitaloxidation an Kaninchenlebermikrosomen, z.B., ist im Phosphat-Puffer bei pH 7,0, im Tris-Puffer dagegen bei pH 8,2 maximal (374).

Eine Beeinflussung des pH-Optimums im Verlaufe der Induktion war nicht zu erwarten (35).

Der über 60 min lineare Substratumsatz an Mäuseleber-Mikrosomen stimmt mit Befunden von GRAM und FOUTS (131) überein, nach denen Mäuseleber- und Kaninchenleber-Mikrosomen verschiedene Fremdstoffe (Hexobarbital, Codein, Zoxazolamin, p-Nitrobenzoesäure, Neoprontosil, Aminopyrin, Benzpyren) 60 bis 90 min lang linear metabolisieren, während sich an Mikrosomen von Ratten z.T. bereits nach weniger als 15 min Sättigungseffekte zeigten.

Im Gegensatz zu der Angabe von AXELROD und BRODIE (39), denen zufolge die Indophenol-Farbreaktion nach 30 min abgeschlossen sein sollte, war in vorliegenden Untersuchungen die Farbentwicklung erst nach 60 min maximal.

5.1.2. Beeinflussung der Anilin-p-hydroxylase in vivo

Die vorliegend im Verlaufe der Induktion durch PB (einmalig 100 mg/kg K.-Gew. i.v.) über einen Zeitraum von 72 Std untersuchte Entwicklung der Aktivität der AH kongruiert im Wesentlichen mit der Bewegung des Cyt P-450-Gehalts (PB einmalig, 80 mg/kg K.-Gew., i.p.) (297).

In Übereinstimmung mit vorliegenden Befunden beobachteten auch GUARINO et al. (142) bei Ratten nach PB-Applikation für die Hydroxylierung von Anilin (Typ I-Verbindung) eine Erhöhung von K_M und V_{max} . Untersuchungen zur Kinetik der oxidativen Metabolisierung von Typ II-Verbindungen (Aminopyrin, Äthylmorphin) nach PB verweisen auf eine Erhöhung von V_{max} bei unveränderter K_M (133, 317).

Die bei Ratten beobachtete höhere Grundaktivität mikrosomaler Enzyme männlicher Tiere (182, 183, 184) konnte am Beispiel der AH auch für Mäuse (Tab. 3) bestätigt werden. Die maximal induzierbare Aktivität war, ebenfalls in Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei der Ratte (294a), bei beiden Geschlechtern gleich (Tab. 3). Analog zu den Befunden an Ratten (182, 183, 184) konnte vorliegend auch bei weiblichen Mäusen eine Erhöhung der AH nach Futterentzug gezeigt werden (Abb. 12, Tab. 4). Futterentzug verstärkte auch die Induktion der AH durch PB (Abb. 12). Ebenfalls übereinstimmend mit Befunden anderer Autoren (100, 380, 381, 382) waren die Erhöhung der AH-Aktivität bei Haltung der Tiere auf Weichholzeinstreu (vgl.: 2.3.8.) und ihre Verringerung bei mangelnder Käfighygiene (vgl.: 2.3.7., Abb. 13). Dagegen konnte der für Mäuse beschriebene Einfluß der Tageszeit auf Fremdstoff-metabolisierende Enzymaktivitäten (71, 381) am Beispiel der AH nicht bestätigt werden (4.4.2.).

5.2. Zur Beeinflussung der durch Phenobarbital induzierten Aktivität der Anilin-p-hydroxylase in der Leber der Maus

5.2.1. Aethionin

5.2.1.1. Wirkungsmechanismus

Die Aminosäure Aethionin ist ein starkes Lebergift und wird auch experimentell zur Erzeugung von Fettlebern verwendet (93, 231, 232, 383, 384). Ihre chemische Verwandtschaft zur essentiellen Aminosäure Methionin läßt sie als deren Antimetabolit wirken (Abb. 30) (84, 92, 93, 94, 354).

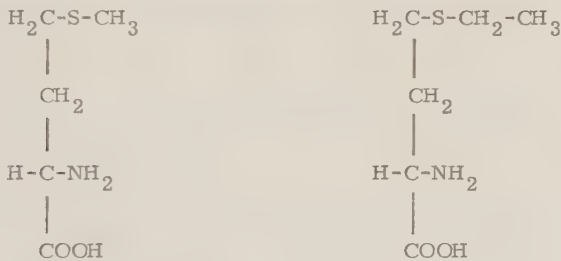


Abb. 30: Methionin und Aethionin.

Da Methionin im Initiator-Komplex als Formylmethionin-tRNA am Start-codon für die Proteinsynthese notwendig ist, hemmt sein Ersatz durch Aethionin diese kompetitiv auf der Initiationsstufe (125, 126, 204, 257, 336). Außerdem reagiert Aethionin mit ATP unter Bildung von S-Adenosyl-aethionin (354). Die dadurch bedingte Verarmung an ATP führt zu einer Disaggregation der Polysomen (110, 126, 311, 349) und somit auch zu einer Hemmung der Peptidketten-Elongation (338). Da ATP außerdem Substrat für die RNA-Polymerase ist, wird auch die RNA-Synthese behindert (65).

5.2.1.2. Befunde

Schon durch Applikation von 50 mg Aethionin/kg K.-Gew. konnte eine vollständige Hemmung der AH-Induktion durch PB in der Leber der Maus erreicht werden (Abb. 21). Diese Dosis ist gegenüber der von GLASER zur Erzeugung einer Fettleber verwendeten von 1044 mg/kg sehr gering (125, 126). Noch 10 mg/kg hemmten die Induktion deutlich, während Dosen von mehr als 50 mg/kg den Anilinumsatz unter das Niveau nicht induzierter Kontrollen senkten (Abb. 21).

Bei Untersuchungen zur Metabolisierung von Pentobarbital, Strychnin und Meprobamat durch Ratten benötigte KATO zur Aufhebung der Induktion durch PB eine Aethionindosis von 200 mg/kg (181). Die Hexobarbital-Schlafzeit-Verkürzung bei Mäusen nach PB war ebenfalls erst mit dieser Dosis aufzuheben (111). In beiden vorgenannten Untersuchungen verringerte sich die Aethioninwirkung mit zunehmendem Abstand der Aethionin- von der PB-Applikation. Während bei gleichzeitiger Gabe die Hemmung in beiden Fällen vollständig war, konnte bei Aethioningabe 24 Stunden nach PB kein Einfluß mehr auf die Hexobarbital-Schlafzeit und 47 Stunden danach auch keine Wirkung mehr auf den verstärkten Metabolismus der oben angegebenen Fremdstoffe nachgewiesen werden (111, 181).

Ein Einfluß des zeitlichen Abstandes der Aethionin- von der PB-Applikation auf die Induktionshemmung konnte in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden.

So war die induzierte Aktivität der AH am stärksten hemmbar, wenn Aethionin eine Stunde vor PB verabreicht wurde, während bei Gabe eine Stunde nach PB die Induktion nur noch um die Hälfte zu verringern war (Tab. 9).

5.2.2. Cycloheximid

5.2.2.1. Wirkungsmechanismus

Cycloheximid (früherer Name: Actidion) ist ein Glutarimid-Antibioticum und enthält wie alle diese Verbindungen eine β -(2-hydroxyäthyl)-Glutarimid-

Hälfte, die an ein cyclisches Keton gebunden ist (Abb. 31). Cycloheximid hat vier asymmetrische Zentren und deshalb viele Stereoisomere.

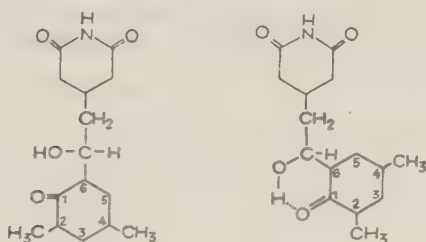


Abb. 31: Cycloheximid in verschiedener Schreibweise der Strukturformel (nach PARTHIER 269).

Cycloheximid (Chi) stabilisiert die Polysomen (394, 398) und verhindert deren Disaggregation nach Gabe von Natrium-Fluorid (53, 127), Puromycin (99), Actinomycin (373) oder Aethionin (373). Es stört aber auch die Wiederbildung der Polysomen nach Entfernung des Natrium-Fluorid (53) oder nach Zusatz von Methionin zu Aethionin-vorbehandelten Polysomen (373).

Die Hemmung der Proteinsynthese beruht nach OBRIG et al. auf einer Fixierung des Ribosom-m-RNA-Aminoacyl-t-RNA-Komplexes durch Hemmung der Translokation der Aminoacyl-t-RNA von der Akzeptor- zur Donorstelle auf dem Ribosom, wodurch das Peptid quasi "in statu nascendi" am Ribosom verbleibt (262). Die Aufhebbarkeit der Chi-Wirkung durch hohe Dosen von Glutathion spricht für eine Reaktion mit SH-Gruppen des Translokase-Systems (250).

In vivo Versuche und daraus gewonnene umfangreiche statistisch-kinetische Analysen verweisen auf eine Hemmung der Peptidknüpfung, wodurch eine Verlängerung der Peptid-Ketten bis zum fertigen Proteinmolekül unmöglich wird (204).

Einigen Autoren zufolge ist auch die Initiation der Proteinsynthese Chi-empfindlich (18, 227, 250, 278), wobei jedoch Chi in keiner Konzentration selektiv die Initiation hemmt (230).

Zur Wirkung von Chi auf die RNA- und DNA-Synthese liegen in Abhängigkeit von der Versuchsanordnung heterogene Befunde vor. Es wird sowohl über Hemmung (95, 112, 243) als auch über Stimulierung (153, 260, 309, 350, 378, 379) berichtet.

Chi beeinflusst die Proteinsynthese ausschließlich von eukaryoten Zellen, da es nur mit 80 S-Ribosomen und hier der 60 S-Untereinheit reagiert (18, 227, 250, 278, weitere Referenzen in 128 und 213).

Als strukturelle Basis der Hemmaktivität von Chi kann die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Hydroxyl- und Ketongruppe gelten, wodurch eine "quasi-Ringstruktur" des Moleküls entsteht (140). Dadurch wird der Abstand zwischen der Imid- und der Hydroxylgruppe auf $5,5 \text{ \AA}$ verringert und entspricht so genau dem Abstand zweier Windungen der Alpha-Helix eines Proteins (269).

5.2.2.2. Befunde

Die Induktion der AH in der Leber der Maus durch PB konnte durch Chi erst in einer Dosis von 100 mg/kg K.-Gew. unterdrückt werden (Abb. 22). Diese Dosis erscheint gegenüber der Ratte, bei welcher bereits 1,5 (95) bzw. 3,0 mg/kg K.-Gew. (278) die Proteinsynthese zu mehr als 90 Prozent und 5,0 mg/kg K.-Gew. (95) zu 98 Prozent hemmten, sehr hoch. Die Maus benötigt jedoch 80 bis 100 mg Chi/kg K.-Gew. zur 94- bis 96prozentigen Hemmung der Proteinsynthese (373). Da aber auch bei der Maus bereits eine Dosis von 4 mg Chi/kg K.-Gew. eine 62- bis 65prozentige Hemmung der Proteinsynthese bewirkte (373), überrascht vorliegend die mit 12 bis 20 Prozent relativ geringe Hemmung der Induktion der AH bei Dosen von 5,0 bis 12,5 mg/kg K.-Gew. (Abb. 22). Die Annahme einer Hemmwirkung auch auf die Synthese eines hypothetischen für den Abbau des Enzyms notwendigen Polypeptids, wie sie für die Tyrosin-transaminase der Rattenleber postuliert wird (196, 197), erklärt die geringe Hemmung der Induktion der AH durch Chi dem Umfang nach nicht.

5.2.3. Actinomycin D

5.2.3.1. Wirkungsmechanismus

Actinomycin D (Act D) (andere Bezeichnungen: Actinomycin C, Dactinomycin) wurde 1940 von WAKSMAN und WOODRUFF entdeckt (385). Das Antibioticum besteht aus einem Phenoxazonring (Chromophor) und zwei lactonartig daran gebundenen cyclischen Pentapeptiden (Abb. 32).

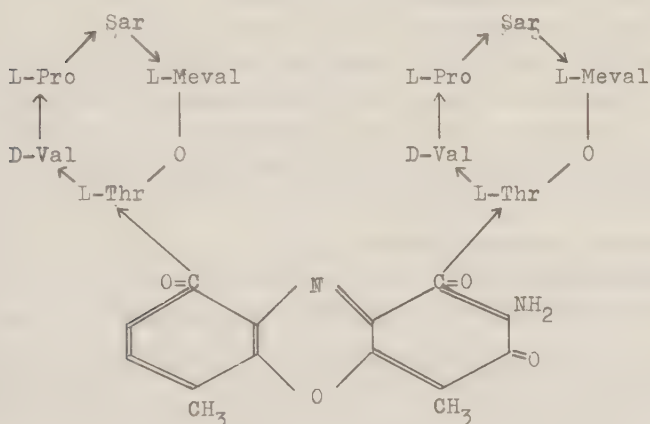


Abb. 32: Actinomycin D.

Thr = Threonin, Val = Valin, Pro = Prolin, Sar = Sarkosin,
Meval = N-Methylvalin

Die verschiedenen Actinomycine unterscheiden sich in der Sequenz dieser Peptide.

Das äußerst toxische Actinomycin (Act D) ist als antimikrobieller Wirkstoff therapeutisch nicht einzusetzen. Neben seiner Verwendung in der experimentellen Molekularbiologie findet es Anwendung in der Krebstherapie.

Act D hemmt die DNA-abhängige RNA-Synthese. Grundlage für die Wirkung ist eine spezifische Verbindung des Antibioticums mit der Doppelstrang-DNA (22, 75, 108, 146, 147, 193, 194, 195). Zugabe von DNA zu

einer Lösung von Act D führt zu einer sofortigen Änderung seiner spektralen Eigenschaften, während RNA das Act D-Spektrum nicht beeinflusst (194, 200, 203, 279). Andererseits verändert auch DNA durch die Bindung an Act D ihre physikalischen Eigenschaften: Schwimmdichte* und Viskosität verringern sich, der Schmelzpunkt steigt (109).

Für die biologische Funktion des Hemmstoffmoleküls sind folgende Voraussetzungen notwendig (130, 281):

1. eine freie NH_2 -Gruppe am Phenoxazonring,
2. der chinoide Sauerstoff des Chromophors,
3. die Peptid-Lactonringe.

Die unter 1. und 2. genannten Gruppierungen werden zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den DNA-Nucleotiden gebraucht. Den Peptiden kommt wahrscheinlich eine sterische Funktion bei der Bindung zu, weil auch von seiten der DNA bestimmte strukturelle Voraussetzungen für eine Komplexbildung gegeben sein müssen (49, 129, 268):

1. die native Doppelhelixstruktur,
2. die NH_2 -Gruppe in 2-Stellung eines Desoxyguanosins,
3. eine bestimmte Orientierung der Bindungsorte in der Helixstruktur.

Aufgrund der Struktur des Act D könnte man zur Charakterisierung seiner Wechselwirkung mit DNA an Interkalierung denken: Planare Moleküle mit kondensierten Ringsystemen können sich an DNA binden, indem sie ihr Ringsystem zwischen die angrenzenden übereinandergeschichteten Basenpaare schieben (386). Physikalische Befunde sprechen jedoch gegen diese Möglichkeit: Die Modellsubstanzen für Interkalierung Acridin und Phenanthridin erhöhen die Viskosität hochmolekularer DNA, während Act D deren Viskosität erniedrigt. Ferner treten die für Interkalierung charakteristischen Änderungen des Röntgenbeugungsspektrums nach Act D-Gabe nicht auf.

Eine befriedigendere Erklärung für die Bindung von Act D an DNA bietet das Modell von GOLDBERG und REICH (130, 280):

In doppelsträngiger DNA treten zwei Spiralfurchen auf (Abb. 33). Man

* (im Englischen als "buoyant density" bezeichnet)

nimmt an, daß Act D sich in die schmale Furche einschiebt und bis zu sieben Wasserstoffbrückenbindungen mit den angrenzenden Teilen des DNA-Moleküls bildet. Abb. 34 zeigt die Geometrie eines Teils dieser Wechselwirkung. Mit diesem Modell werden die für die Wechselwirkung notwendigen strukturellen Merkmale von Act D und der DNA ausgezeichnet erklärt. Ein unreduzierter, chinoider Sauerstoff am Antibioticum ist beispielsweise unentbehrlich, wenn dieses als Akzeptor von Wasserstoffbrückenbindungen dienen soll. Zur Wasserstoffbrückenbindung ist auch eine freie, chromophore Aminogruppe notwendig. Vermutlich bilden die Peptidlaktonringe Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Stickstoffatomen der Peptidbindungen und den Sauerstoffatomen der Phosphodiesterbindungen des DNA-Stranges, der dem DNA-Strang mit dem Guanosinrest gegenüberliegt. Der Guanosinrest tritt mit dem Chromophor des Antibiotiums in Wechselwirkung.

Die Anwesenheit von Guanin in der DNA als Voraussetzung für diese Wechselwirkung wird in diesem Modell auf sehr elegante Weise erklärt: Nur diese Base kann in natürlich vorkommender DNA ein Wasserstoffatom in der schmalen Furche bereitstellen, das an den chinoiden Sauerstoff des Antibiotiums bindet. 2,6-Diaminopurin, obwohl genau genommen eine analoge Verbindung von Adenin und nicht von Guanin, kann ebenfalls das entscheidende Wasserstoffatom in der schmalen Furche bereitstellen (49). Auf diese Weise ermöglicht es ebenfalls die Wechselwirkung zwischen Act D und synthetischen DNA-Polymeren, in denen Guanin durch 2,6-Diaminopurin ersetzt ist.

Schließlich zeigen Modellstudien, daß nur doppelsträngige helikale DNA in der hydratisierten B-Konfiguration die besondere sterische Anordnung besitzt, in der diese Art von Wechselwirkung stattfinden kann (143). Vielleicht geht Act D deshalb auch keine Wechselwirkung mit der Doppelstrang-RNA ein, weil dieses helikale Makromolekül in der A-Konfiguration vorliegt (145).

Welche Erklärung auch immer zutreffen mag, fest steht, daß die Verlängerung der RNA-Ketten, die an der DNA-Matrize synthetisiert werden, blockiert wird. Andererseits ist die Initiierung neuer RNA-Ketten gegenüber dem Antibioticum sehr viel weniger empfindlich, Act D verhindert

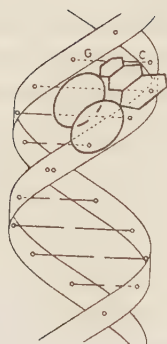


Abb. 33

Abb. 33: Darstellung von Actinomycin, wie es in der schmalen Furche von Doppelstrang-DNA vorliegt (nach WARING, 387).

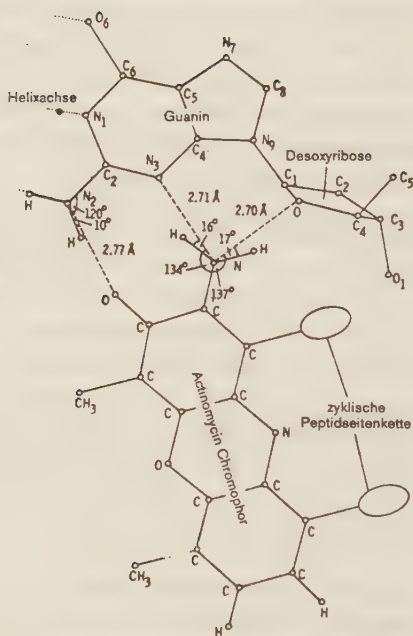


Abb. 34

Abb. 34: Vorstellung der Bindungsweise von Actinomycin an das Desoxyguanosin der DNA. Die gestrichelten Linien deuten die Ausbildung von Wasserstoffbrücken an (nach HAMILTON, 143).

die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA-Matrize nicht. Die Hemmung der RNA-Kettenverlängerung ist daher vermutlich mit einer gestörten Bewegung der Polymerase durch den Bereich der DNA, an den sich das Antibioticum bindet, zu erklären.

Verglichen mit der alle Einzelheiten erfassenden Analyse der Wechselwirkung zwischen Act D und DNA ist der Mechanismus, nach dem das Antibioticum die RNA-Polymerisation hemmt, relativ wenig erforscht. Man kann dieses Problem wohl erst dann besser verstehen, wenn mehr über den Wirkungsmechanismus der RNA-Polymerase bekannt ist.

5.2.3.2. Befunde

Wurde Act D in Dosen von 0,4 bis 1,2 mg/kg K.-Gew. eine Stunde vor der Applikation von 100 mg PB/kg K.-Gew. injiziert, war die nach 24 Stunden untersuchte Induktion der AH deutlich dosisabhängig gehemmt (Abb. 24).

Während sich dieser Befund unschwer dem skizzierten Wirkungsmechanismus von Act D zuordnen läßt, erscheint die Induktionsverstärkung durch Dosen von 0,1 bis 0,3 mg Act D/kg K.-Gew. paradox (Abb. 24).

Eine vergleichbare Beobachtung wurde von ERNSTER et al. nach Gabe von Act D an durch PB vorinduzierten Rattenlebern bei der Untersuchung der Aminopyrin-N-demethylase gemacht (87). Auch hier bewirkte Act D eine weitere Stimulierung.

Zum Verständnis dieser "paradoxen" oder "Superinduktions"-Effekte durch Act D sind folgende Überlegungen notwendig: Die Annahme, daß durch Act D die Proteinsynthese schlechthin gehemmt wird, stellt eine mittlerweile nicht mehr uneingeschränkt haltbare Vereinfachung dar, wie sich aus dem Aktivitätsanstieg vieler Enzyme im Laufe einer Act D-Behandlung von Versuchstieren, Bakterien- und Zellkulturen ergibt. Inzwischen wurde eine Fülle von Beobachtungen über stimulierende Wirkungen von Act D auf die Proteinsynthese zusammengestellt (369). Am Beispiel der Induktion der Tyrosin-aminotransferase (TAT) durch Dexamethason in Rattenhepatomzellen entwickelten THOMPSON et al. ein Modell für die Superinduktion durch Act D (363, 364, 367 - 371). Es besitzt

jedoch nur unter der Voraussetzung Gültigkeit, daß die Enzymsynthese durch einen Repressor gesteuert wird. Nach diesem Modell blockiert Act D in höheren Konzentrationen die Synthese einer spezifischen, relativ labilen RNA (= Repressor, R), die entweder direkt oder durch eine Kette labiler Produkte die vollständige Translation von TAT-mRNA verhindert, während es in niedrigen Konzentrationen nur das Gen für die Synthese (= strukturelles Gen) der mRNA für das Enzym hemmt (Abb.35).

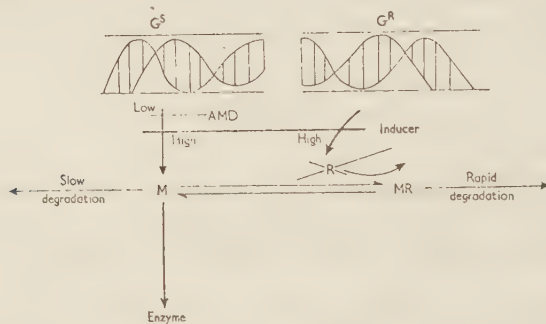


Abb. 35: Modell für die Regulation der Enzymsynthese unter dem Einfluß von Actinomycin D und einem Induktor (nach THOMPSON et al., 363).

G^S = Gen für die Synthese des Enzyms (strukturelles Gen)

G^R = Gen für die Synthese des Repressors

M = mRNA für Enzym

R = Repressor

Die Synthese des Repressors wird durch den Enzyminduktor verursacht und stellt einen Regulationsmechanismus dar, der auf Vorstellungen von JACOB und MONOD zurückgeht (168). Der aktive Messenger für das Enzym wird langsam abgebaut, der inaktive Komplex aus Messenger und Repressor hingegen sehr schnell. Da das Gen für den Repressor erst nach einer gewissen Latenzperiode aktiv wird, in der das strukturelle Gen mRNA für das Enzym synthetisiert, kann das Repressorgen (zusammen mit dem strukturellen Gen) zum Zeitpunkt der maximalen Wirksamkeit des Induktors durch Act D-Gabe gehemmt werden. Dadurch kann der vor-

handene langlebige Messenger ungehindert für die Synthese des Enzymproteins verwendet werden.

Der in vorliegender Arbeit beobachtete zusätzliche Aktivitätsanstieg der AH durch Act D-Gabe nach maximaler Induktion (Abb. 26) ordnet sich grundsätzlich gut in die skizzierte Modellvorstellung ein. Nicht ohne weiteres erklärbar ist allerdings die dabei beobachtete umgekehrte Dosisabhängigkeit in der Intensität der Superinduktion, wie sie sich auch zeigte, wenn Act D eine Stunde vor PB appliziert wurde (Abb. 24).

Diese Befunde wären unter der hypothetischen Voraussetzung verständlich, daß im Regelkreis des vorliegend untersuchten Enzyms das Re-pressorgen gegenüber Act D eine höhere Empfindlichkeit aufweist als das Strukturgen. Auch die Induktionsverstärkung nach mehrmaliger Applikation sehr kleiner Act D-Mengen vor der Induktion durch PB (vgl.: 4.6.3.2.) und die geringe, jedoch dosisabhängige Wirkung auf die nicht induzierte AH-Aktivität (Abb. 25) wäre so erklärbar.

Eine direkte Wechselwirkung zwischen Act D und der AH im Sinne einer Aktivierung durch niedrige Act D-Konzentrationen und einer Inaktivierung durch hohe Act D-Konzentrationen läßt sich ausschließen, da sowohl niedrige (0,15 mg/kg) als auch hohe (0,6 mg/kg) Act D-Konzentrationen die durch PB schon erhöhte $V_{\max}$ nochmals deutlich erhöhen, während sie K_M nicht weiter verändern (Tab. 6, Abb. 27).

5.2.4. Röntgenstrahlen

5.2.4.1. Wirkungsmechanismus

Zu den auffälligsten biologischen Wirkungen ionisierender Strahlen gehören Veränderungen im Bereich des Zellkernstoffwechsels. Sie äußern sich u.a. in der Hemmung von Zellteilung und DNA-Synthese und sind zu einem wesentlichen Teil auf Schäden an Strukturen, insbesondere am Desoxyribonucleoprotein-Komplex des Zellkerns zurückzuführen (45, 73, 330, 360).

Inwieweit die Hemmung von DNA-Synthese und Zellteilung nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen mit der Synthesehemmung *b e s t i m m t e r*, für den Zellteilungsstoffwechsel essentieller Proteine und/oder mit nachgewiesenen Störungen im Stoffwechsel der nukleären energiereichen Phosphate (6, 15, 173) in Zusammenhang zu bringen ist, ist vorläufig nicht zu entscheiden.

Die Matrizenfunktion der DNA für die Proteinsynthese allgemein ist offenbar weniger strahlenempfindlich (274, 331). Der Grund wird u.a. darin gesehen, daß mRNA-Synthese nur an begrenzten Teilbereichen des DNA-Moleküls erfolgt (357), sodaß auch DNA-Bruchstücke, welche die notwendige Information enthalten, transkribiert werden können (357). Die im Zytoplasma stattfindende *T r a n s l a t i o n* wird erst sekundär beeinflusst, da sie zunächst mit der noch vorhandenen RNA bzw. den bereits vor Bestrahlung gebildeten Enzymproteinen weiterlaufen kann (357).

Während der Proteingehalt ausgesprochen strahlenempfindlicher Organe (wie der Lymphatischen Organe und des Magen-Darm-Trakts) von Säugetieren nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung rasch abnimmt, zeigten weniger strahlenempfindliche Organe (wie Leber oder Niere) hinsichtlich des gleichen Parameters nach Strahlendosen von weniger als 1000R *k e i n e* signifikanten Veränderungen (357).

Über einen *A n s t i e g* der mikrosomalen Proteinsynthese in einem zellfreien System aus der Leber von Ratten, die 3 - 15 Tage zuvor mit 600R ganzkörperbestrahlt worden waren, berichten CORLESS und GRAY (64). Da sich unter vergleichbaren Bedingungen auch der relative RNA-Gehalt der Mikrosomen erhöht, könnte dem erhöhten RNA-Gehalt kausale Bedeutung für die verstärkte Proteinsynthese zukommen.

Über einen Anstieg der Bildung von RNA, RNA-Polymerase und Ribosomen in der Leber nach GKB berichteten u.a. HIDVEGI (155, 156), BAEYENS (17) und KÖNIG (209). Da sich die Nebennierenrinden-Aktivität nach GKB erhöht (101, 209), wurde die Frage aufgeworfen, ob die erhöhten Syntheseraten im Bereich des Proteinstoffwechsels letztlich nicht über die vermehrte Ausschüttung von Glucocorticoiden, d.h. sekundär zustandekommen (357).

Strahleneinflüsse auf Aktivität und Induktion mikrosomaler, fremdstoffmetabolisierender Enzyme hängen nach Eintritt, Art und Umfang offenbar in besonderem Maße von den jeweiligen Versuchsbedingungen ab. Nur so ist es erklärlich, daß von verschiedenen Untersuchern sowohl über stimulierende (26, 340, 341) als auch hemmende (206, 207, 221, 222, 340, 341, 404) Einflüsse berichtet wird, oder gar Effekte jedweder Art vermißt werden (358, 403).

5.2.4.2. Befunde

GKB (102 bis 816 rd) von Mäusen 1 Std vor PB hatte keinen Einfluß auf die AH-Induktion. Vergleichbare Beobachtungen machten HILTON et al. bei Ratten (158, 159): Bei GKB 0 - 24 Std nach PB-Gabe (75 mg/kg K-Gew.) und Aufarbeitung 24 Std nach PB-Gabe zeigte die Induktion der AH keine signifikanten Änderungen gegenüber dem Kontrolldurchschnitt.

Auch NAIR et al. (253, 254) beobachteten nach Bestrahlung keine Abnahme der durch PB verursachten Hexobarbital-Schlafzeitverkürzung.

Als Erklärung der vorliegend beobachteten Induktionsverstärkung ("Superinduktion") der AH (PB-Gabe 4 Std nach einmaliger, akuter GKB mit 408 rd sowie mehrmaliger GKB mit Dosen von 51 bzw. 102 rd) sind grundsätzlich folgende Möglichkeiten in Betracht zu ziehen:

1. GKB bewirkt eine verminderte bzw. sistierende Futteraufnahme, die ihrerseits zu einer erhöhten AH-Aktivität führt (vgl.: Abb. 4, Tab. 12).
2. Da sowohl der Metabolismus als auch die renale Ausscheidung von Barbituraten nach Bestrahlung vermindert sein können (70, 251, 252, 253), könnte die Induktionsverstärkung über Konzentrationserhöhung sowie längere Verweilzeit des Induktors (PB) im Organismus zustandekommen.

3. Die "Superinduktion" könnte biochemischer Ausdruck einer allgemeinen, über Corticosteroide vermittelten Steigerung der Proteinsynthese nach Bestrahlung sein.
4. Die durch Strahlenschäden an der DNA entstandenen Einzelstrangbruchstücke bilden zusätzliche Startpunkte für die mRNA der AH (6, 357).
5. Unter der Annahme, daß an der Regulation der AH-Aktivität ein Repressor beteiligt ist (vgl.: 5.2.3.2), könnte dieser bzw. sein Genom strahlenempfindlicher sein als das strukturelle Gen für die AH-Synthese.

Von den genannten Erklärungsmöglichkeiten sind die unter 1, 3 und 4 genannten aus folgenden Gründen auszuschließen:

Zu 1:

Bestrahlung zeigte keine Induktionswirkung bei nicht mit PB behandelten Tieren, bei welchen Futterentzug die AH-Aktivität deutlich steigerte, während sie andererseits die durch Futterentzug bewirkte "Superinduktion" noch beträchtlich verstärkte.

Zu 3:

An einem a l l g e m e i n e n, durch Bestrahlung induzierten und über Corticosteroide vermittelten Anstieg der Proteinsynthese wäre die Aktivität der AH in etwa gleichem Umfange beteiligt. Im Gegensatz zu den hier vorgelegten Ergebnissen wäre der Aktivitätszuwachs des Enzyms bei Bezug auf die Gewichtseinheit P r o t e i n nicht mehr nachweisbar.

Zu 4:

Die Schaffung neuer Startpunkte für die mRNA der AH sollte grundsätzlich auch an röntgenbestrahlten, aber nicht mit PB behandelten Tieren nachweisbar sein. Bei diesen aber blieb die AH-Aktivität unbeeinflusst.

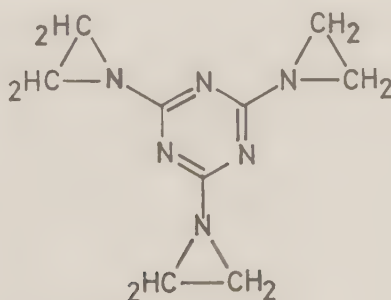
Eine Entscheidung zwischen den verbleibenden (unter 2 und 5 skizzierten) Erklärungsversuchen ist demgegenüber aufgrund der vorliegenden Untersuchungen vorläufig nicht möglich.

5.2.5. 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin

5.2.5.1. Wirkungsmechanismus

2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin (TEM) wird den radiomimetischen Substanzen zugerechnet. Radiomimetica sind chemische Verbindungen, die ähnliche Endwirkungen am biologischen Objekt besitzen wie ionisierende Strahlen (81). Sie wirken auf den Ruhekern mutagen und karzinogen, hemmen die Mitose und erzeugen echte Chromosomenbrüche (16:p.195). Zu den Radiomimetica gehören neben Schwefel- und Stickstofflostderivaten, Äthylenimininen, Epoxiden und Methansulfonsäureestern (11, 97) auch Nitrosoharnstoffderivate, die neuerdings zur Erzeugung von Experimentaltumoren herangezogen werden (244). Der im englischen Schrifttum anstelle von "Radiomimetica" häufig gebrauchte Begriff "biological alkylating agents" umfaßt alle Verbindungen, die in einem anderen Molekül ein Wasserstoffatom durch ein Alkylradikal ersetzen können.

Das Wesen der Alkylierungsreaktion besteht in dem Angriff eines instabilen, elektronenarmen ("elektrophilen") Alkylradikals auf ein elektronenreiches ("nucleophiles") Zentrum. Substanzen mit zwei oder mehr alkylierenden Gruppen (bi- oder polyfunktionell) sind dabei bedeutend wirksamer als solche mit nur einer derartigen Gruppe (16:p.199, 360).



Wie Abb. 36 zeigt, besitzt TEM drei solcher Wirkungsgruppen. Die alkylierende Wirkung des Äthylenimins beruht auf einer sehr leicht erfolgenden Öffnung des "energetisch gespannten" Äthyleniminringes in wässrigem Milieu. Dabei können z.B. biologische Bausteine oder Enzyme mit leicht beweglichen Wasserstoffatomen alkyliert und damit denaturiert werden (11).

Von den meisten Autoren wird der Reaktion der alkylierenden Substanzen mit der DNA eine vorrangige Bedeutung zuerkannt (4, 25, 199, 314, 327). Der bevorzugte Reaktionsort am DNA-Molekül wird von der Art der radio-mimetisch wirksamen Verbindung bestimmt. Stickstofflost-Derivate z.B. greifen vorwiegend den Stickstoff in Position 7 des Guanins an. Die Alkylierung in dieser Position verursacht eine Lockerung der glykosidischen Bindung zwischen der Purinbase und der Desoxyribose. Die Sprengung dieser Bindung führt zur Freisetzung von alkyliertem Guanin und zur Depurinisation der DNA (314). Damit besteht die Möglichkeit einer im Anschluß daran auftretenden Lockerung der Desoxyribose-Phosphat-Bindung und einer Kettenruptur der DNA (3). Wenn jedoch diese einfach alkylierte DNA intakt bleibt, kann sie als Matrize zur DNA-Replikation benutzt werden. Die Folge davon wäre eine fehlerhafte Basenpaarung am Ort des alkylierten Guanin, woraus eine Alteration des genetischen Code resultiert. Andererseits können auch Vernetzungen an der DNA durch bi- und polyfunktionell alkylierende Mittel zur Beeinträchtigung oder Aufhebung der Funktion führen (224, 319).

Als besonders empfindlich gilt die DNA-Synthese des Zellkerns (237, 239).

Nach NEUBERT (256) werden radioaktiv markierte alkylierende Substanzen allerdings an die Mitochondrien-DNA in wesentlich stärkerem Maße gebunden als an die Zellkern-DNA. Auch die daraus resultierende Hemmung der RNA-Polymerase ist an Mitochondrien aus Tumorzellen wesentlich stärker ausgeprägt als in den entsprechenden Zellkernen. Dieser Befund weist auf die Möglichkeit hin, daß die Wirkungen von biologischen Alkylantien auf den Zellkern bislang überbewertet wurden.

Nach KUMMER und OCHS (219) könnte die Hemmung der DNA-Synthese durch alkylierende Cytostatica auf einer Blockierung der mRNA-Synthese der Ribonucleotid-reductase beruhen.

Die Wirkung von TEM auf die Proteinsynthese untersuchten COMOROSAN et al. an Tumorzellkulturen (Epidermoidkarzinom) mit Hilfe markierter

Substanzen (54). Nach Inkubation mit TEM wurden dabei der Einbau von ^{14}C -Arginin in Kernproteine und der Einbau von ^{14}C -Leucin in cytoplasmatische Proteine gehemmt (stündliche Inkubation von 1,6 μmol TEM/l Medium). Ferner ergab sich eine Dissoziation der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese. Die aus TEM-behandelten Kulturen extrahierten Desoxyribonucleo-Protein-Komplexe zeigten ein verändertes Protein/DNA-Verhältnis sowie veränderte Löslichkeitscharakteristiken in Lösungen verschiedener Ionenstärke.

5.2.5.2. Befunde

Während sich die Hemmung der AH-Induktion durch 40 mg TEM/kg K.-Gew. unschwer dem skizzierten Wirkungsmechanismus zuordnen läßt, erscheint die Induktionsverstärkung (durch kleinere Dosen, mit zunehmendem Zeitabstand zwischen TEM- und nachfolgender PB-Applikation, durch mehrfache Gabe kleiner TEM-Dosen) zunächst paradox (Abb. 16, 18, 19). Es werden jedoch mehrere Fälle von Enzyminduktion bzw. Induktionsverstärkung durch Radiomimetica beschrieben. So berichten BARTH und MAAS (20) von einer Erhöhung der nach Teilhepatektomie von Ratten regenerationsbedingten Induktion von Lactat-dehydrogenase und Thymidilat-synthetase durch Trenimon-Verabreichung (0,15 mg/kg K.-Gew. i.p.) 1 Tag vor der Operation. DONELLI und GARATTINI (78) beobachteten einen Anstieg der Anilin- und p-Nitroanisol-Metabolisierung 9 Tage nach der letzten von insgesamt 6 Gaben von Cyclophosphamid bzw. Chlorambucil (4,0 bzw. 16,0 mg/kg K.-Gew. i.p., entsprechend 1/3 der LD_{50}). TRAEGER et al. (372) berichteten von einem Anstieg der Aminopyrin-N-demethylase nach Gabe von Cyclophosphamid, Chloromethin oder Trichloromethin (14,0 bzw. 0,05 mg/kg K.-Gew., 2 x wöchentlich über 8 Wochen). Während DONELLI und GARATTINI (78) keine Erklärung für ihre Befunde anbieten, nehmen BARTH und MAAS (20) an, daß in der Leber ein maskierter, relativ stabiler Messenger für die Enzymsynthese vorhanden ist, dessen Freigabe eine erhöhte Synthese ermöglicht (Induktion also auf der Translations-, nicht auf der Transkriptionsebene). TRAEGER et al. (377) ziehen sowohl Induktion als auch Freisetzung strukturgebundener Enzyme in Betracht.

Obwohl keine der angebotenen Hypothesen bei Erklärung der h i e r vorgelegten Befunde mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, bieten sich die zur Deutung der induktionsverstärkenden Wirkung von GKB und Actinomycin D bereits herangezogenen Erklärungsversuche auch für TEM an. Sie umfassen

1. Konzentrationserhöhung und Persistenz des Induktors durch Hemmung des PB-abbauenden Enzymsystems der Leber (demgegenüber die auch bei kleinen Dosen nicht auszuschließende Induktions-Hemmung in den Hintergrund tritt) und/oder
2. die Annahme eines Repressors der Synthese des AH-Systems, dessen Genom sowohl gegenüber Actinomycin D als auch gegenüber Röntgenstrahlen und TEM empfindlicher ist als das Strukturgen der AH.

Eine Entscheidung zwischen den genannten Mechanismen bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Dabei ist insbesondere das Verhalten der PB-Konzentration der Leber unter dem Einfluß von Röntgenstrahlen, Actinomycin D und biologischen Alkylantien zu untersuchen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

An rund 1500 weiblichen weißen Mäusen im Gewicht von $20,7 \pm 2,7$ g wurden Untersuchungen zur Induktion der Anilin-p-hydroxylase (AH) in der Leber nach einmaliger i.v. Injektion von 100 mg Phenobarbital (PB)/kg K.-Gew. durchgeführt. Neben einigen Reaktionsbedingungen der AH-Akt. in vitro wurde dabei insbesondere der Einfluß von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung (GKB: 51 bis 816 rd), 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin (TEM: i.v.: 0,25 bis 40 mg/kg K.-Gew.) und Hemmstoffen der Proteinsynthese (Aethionin: i.v.: 5 bis 400 mg/kg K.-Gew., Cycloheximid: i.v.: 5 bis 100 mg/kg K.-Gew., Actinomycin D: i.v.: 0,0375 bis 1,2 mg/kg K.-Gew.) auf den Induktionsvorgang untersucht. Die wesentlichsten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war die AH-Akt. bei einem pH-Wert von 7,8 bis 8,0 optimal.

Die p-Aminophenol-Bildung verlief innerhalb eines Zeitraums von 5 bis 60 min linear.

Die Indophenolreaktion war erst nach 60 min abgeschlossen. Die Induktion der AH durchlief nach etwa 48 Std ihr Maximum und war noch nach 72 Std nachweisbar. Sowohl K_M als auch V_{max} waren dabei erhöht.

Futterentzug (24 bzw. 48 Std) vergrößerte die AH-Akt. sowohl bei Kontrolltieren als auch bei PB-behandelten weiblichen Mäusen. Dieser Effekt war bei Haltung auf Weichholzeinstreu gegenüber einstreuloser Haltung verstärkt. Zu Verminderung der AH-Akt. kam es, wenn die Käfigreinigung 48 Std unterblieb.

2. GKB (einmalig 204 bis 816 rd) 1 Std vor PB-Gabe beeinflusste die Induktion der AH nicht, während GKB (408 rd) 4 bis 16 Std vor PB-Gabe die Induktion der AH verstärkte. Auch 4 x im Abstand von 24 Std wiederholte GKB (4 x 51 bzw. 102 rd) erhöhte die nachfolgende Induktion der AH durch PB.

3. Wurde TEM eine Std vor PB verabfolgt, hemmten Dosen von 40 mg/kg K.-Gew. die Induktion, während solche von 5 bzw. 10 mg/kg K.-Gew. die Induktion vergrößerten. Diese Induktionsverstärkung war besonders ausge-

prägt, wenn TEM 16 bzw. 24 Std vor PB appliziert wurde. 4 x im Abstand von 24 Std wiederholte Gaben kleiner Dosen ($4 \times 0,25$ bis $2,0$ mg/kg K.-Gew.) von TEM verstärkten die nachfolgende Induktion der AH durch PB ebenfalls.

4. Aethionin (einmalig 5 bis 400 mg/kg K.-Gew.) hemmte die Induktion der AH durch PB dosisabhängig, wobei bereits 50 mg/kg K.-Gew. die Induktion vollständig verhinderten. Die Hemmung war am stärksten, wenn Aethionin eine Std vor PB verabreicht wurde.

5. Cycloheximid (einmalig 5 bis 100 mg/kg K.-Gew.) hemmte die Induktion der AH durch PB dosisabhängig. Zur Aufhebung des Induktionsvorganges war allerdings eine Dosis von 100 mg/kg K.-Gew. erforderlich.

6. In Dosen von 0,4 bis 1,2 mg/kg K.-Gew. hemmte Actinomycin D die Induktion der AH durch PB, während es in einem Dosisbereich von 0,1 bis 0,3 mg/kg K.-Gew. zu einer Verstärkung der Induktion kam. Durch 4 x im Abstand von 24 Std wiederholte Gaben kleiner Dosen ($37,5$ bzw. 75 µg/kg K.-Gew.) von Actinomycin D war die nachfolgende Induktion zu verstärken.

Wurde Actinomycin D ($0,15$ bis $0,6$ mg/kg K.-Gew.) 48 Std. nach PB appliziert, war nach 72 Stunden die Induktion noch nicht abgeschwächt. Zu diesem Versuchszeitpunkt blieb K_M gegenüber der PB-Kontrolle unverändert, während V_{max} fast verdoppelt wurde.

7. Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Induktion der AH durch PB verhielten sich Aethionin und Actinomycin D bzw. Aethionin und Cycloheximid bei gleichzeitiger Gabe 1 Std. vor PB summativ.

8. Als mögliche Erklärung der nach GKB, TEM und Actinomycin D beobachteten "Superinduktion" wird die, verglichen mit dem strukturellen Gen für die AH, stärkere Empfindlichkeit der Transkription eines hypothetischen Repressorgens gegenüber den genannten Noxen diskutiert.

Investigations on the induction of aniline p-hydroxylase in the liver of the mouse: Effects of whole-body x-irradiation, 2,4,6-triethyleimino-s-triazine, and inhibitors of protein synthesis

SUMMARY

Investigations concerning the induction of aniline p-hydroxylase (AH) in the liver after a single injection of 100 mg phenobarbital (PB)/kg b.-wt. were carried out with about 1500 female albino mice having an average body-weight of 20.7 ± 2.7 g. Special attention was paid to the influence of whole-body x-irradiation (x-irr.: 51 to 102 rd), 2,4,6-triethyleimino-s-triazine, (TEM: i.v.: 0.25 to 40 mg/kg b.-wt.), and inhibitors of protein synthesis (ethionine: i.v.: 5 to 400 mg/kg b.-wt., cycloheximide: i.v.: 5 to 100 mg/kg b.-wt., actinomycin D: i.v.: 0.0375 to 1.2 mg/kg b.-wt.) on the induction phenomenon. Some conditions of in vitro activity of AH were an additional subject of this thesis.

The main results can be summarized as follows:

1. Under the chosen experimental conditions AH activity was optimal at pH 7.8 to 8.0.

The formation of p-aminophenol ran linearly within a period of 5 to 60 min. The indophenol reaction has been complete within 60 min. The induction maximum of AH by PB was reached within about 48 h. As late as 72 h after the onset of experiment the induction did not return to control values. K_M as well as V_{max} were increased under conditions of induction of AH. Food deprivation (24 resp. 48 h) increased AH activity of untreated as well as PB treated female mice. This effect was enhanced, when mice were maintained on softwood bedding as compared to controls without bedding. The neglect of cage cleaning for 48 h lowered the AH activity.

2. X-irr. (once 204 to 816 rd) 1 h before PB application showed no significant effect on AH induction.

X-irr. (4 x 51 resp. 102 rd), repeated 4 x at 24 h intervals, increased the following AH induction.

3. Induction was depressed by application of a single dose of 40 mg TEM/kg b.-wt., whereas it was enhanced by a single dose of 5 resp. 10 mg/kg

b.-wt.. This enhancement of induction was particularly pronounced if TEM was applied 16 or 24 h before PB. Repeated application of small doses of TEM (4×0.25 to 2.0 mg/kg b.-wt.) $4 \times$ at intervals of 24 h increased the following induction of AH by PB.

4. Ethionine (single appl., 5 to 400 mg/kg b.-wt.) depressed AH induction by PB dose-dependently, whereby a dose of 50 mg/kg b.-wt. suppressed induction totally.

5. Cycloheximide (single appl., 5 to 100 mg/kg b.-wt.) depressed AH induction by PB dose-dependently, whereby only the relatively high dose of 100 mg/kg b.-wt. suppressed induction totally.

6. Actinomycin D in doses of 0.4 to 1.2 mg/kg b.-wt. depressed AH induction by PB, whereas it caused increased AH induction in the dose range of 0.1 to 0.3 mg/kg b.-wt..

Repeated application of small doses (37.5 resp. 75 μ g/kg b.-wt.) of Actinomycin D, $4 \times$ at 24 h intervals, enhanced the following AH induction by PB.

If Actinomycin D (0.15 to 0.6 mg/kg b.-wt.) was applied 48 h after PB, induction was still not reduced after 72 h. At this time K_M remained unchanged compared to the PB control, whereas V_{max} was nearly doubled.

7. Regarding inhibiting doses, combinations of ethionine and actinomycin D or ethionine and cycloheximide resp. resulted in additive effects on induction of AH by PB.

8. As a possible explanation of the observed "superinduction" following x-irr., TEM, and Actinomycin D, a higher sensibility of the transcription of a hypothetical repressor gene, compared to the structural gene, is discussed after the above mentioned noxes.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ACROS, J.C., A.H. CONNEY, and N.P. BUU-HOI:
Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes.
J. biol. Chem. 236, 1291 (1961)
2. ADAMSON, R.H., F. ALEU, and J.R. FOUTS:
Factors affecting drug metabolism by liver microsomes.
II: Liver tumors.
The Pharmacologist 1, 54 (1959)
3. ALEXANDER, P.:
Interference with the formation of a nucleoprotein complex by radiomimetic compounds.
Nature 169, 226 (1952)
4. ALEXANDER, P.:
Comparison of the mode of action by which some alkylating agents and ionizing radiations kill mammalian cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 163, 652-675 (1969)
5. ALSLEBEN, B.:
Der Abbau von Pethidin und anderen Arzneimitteln durch mikrosomale Leberenzyme bei normalen und gewöhnten Ratten.
Med. Diss., Berlin 1963
6. ALTMAN, K.J., G.B. GEBBER, and S. OKADA:
Radiation Biochemistry. Vol II: Tissues and body fluids.
New York, London: Academic Press 1970
7. ALVARES, A.P., G. SCHILLING, W. LEVIN, and R. KUNTZMAN:
Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
Biochem. biophys. Res. Commun. 29, 521 (1967)
8. ARIAS, I.M., D. DOYLE, and E.T. SCHIMKE:
Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver.
J. biol. Chem. 244, 3303 (1969)
9. ARIYOSHI, T., E. TAKABATAKE, and H. REMMER:
Drug metabolism in ethanol induced fatty liver.
Life Sci. 9, 361 (1970)
10. ARIYOSHI, T. and E. TAKABATAKE:
Effects of phenobarbital, ethanol and ethionine on the content and fatty acid composition of hepatic microsomal phospholipids.
Chem. pharm. Bull. (Tokyo) 20, 170 (1972)

11. ARNOLD, H.:
Einführung in die Chemie der Zytostatica.
Strahlentherapie 119, 147 (1962)
12. ARNOLD, K. and N. GERBER:
The rate of decline of diphenylhydantoin in human plasma.
Clin. Pharmacol. Ther. 11, 121 (1970)
13. AXELROD, J.:
The enzymatic deamination of amphetamine (Benzedrine).
J. biol. Chem. 214, 741 (1955)
14. AXELROD, J.:
Biochemical factors in the activation and inactivation of drugs.
Naumyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. Pharmacol. 238, 24 (1960)
15. BACCETTI, S. and W.K. Sinclair:
The effect of x-rays on the synthesis of DNA, RNA and protein
in synchronized chinese hamster cells.
Radiat. Res. 45, 598 (1971)
16. BACQ, Z.M. und P. ALEXANDER:
Grundlagen der Strahlenbiologie.
Stuttgart: Thieme 1958
17. BAEYENS, W., R. GOUTIER, and V. VANGHEEL:
Radiation-induced alteration in the synthesis of ribosomal and
informosomal particles in rat liver.
Strahlentherapie 147, 660 (1974)
18. BALIGA, B.S., A.W. PRONCZUK, and H.N. MUNRO:
Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a
cell-free system prepared from rat liver.
J. biol. Chem. 244, 4480 (1969)
19. BARONE, C., A. DANI, A. CITTACHINI, T. GALEOTTI, G. GAMBASSI, and
T. TERRANOVA:
Modified reactivity of cytochrome P-450 after phenobarbital induction.
p 337, Abstr. 7c2 in:
IX. Internat. Congr. Biochem. (Ed.: IUB) Stockholm: 1973
20. BARTH, O. und H. MAASS:
Verhalten von Enzymaktivitäten, speziell der Thymidylatsynthetase,
nach Hepatektomie und deren Beeinflussbarkeit durch Trenimon und
Aktinomycin.
Z. Krebsforsch. 75, 45 (1970)
21. BARTHER, F.C., C.S. DELEA, and F. HALBERG:
A map of blood and urinary changes related to circadian variations
in adrenal cortical function in normal subjects.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 98, 969 (1962)

22. BECHER, F.F., A.A. MARGOLIS, and W. TROLL:
In vitro complex formation of actinomycin D and
deoxyribonucleic acid.
Nature 211, 84 (1966)
23. BECKETT, A.H. and E.J. TRIGGS:
Enzyme induction in man caused by smoking.
Nature 216, 587 (1967)
24. BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZOK, K.J. GARRADE,
E. MEYER-ARENDT, und G. PFLEIDERER:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceralddehyd-Dehydrogenase,
Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und
Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
25. BERGEL, F.:
Gegenwärtiger Stand der Krebs-Chemotherapie.
Erg. Physiol., biol. Chem. und exp. Pharm. 62, 101-106 (1970)
26. BERNDT, J. and R. GAUMERT:
Stimulation of hydroxymethylglutaryl-coenzyme
A reductase in mouse liver by x-rays.
FEBS Letters 13, 49 (1971)
27. BEYER, H.:
Lehrbuch der organischen Chemie, p. 279
Leipzig: Hirzel 1968
28. BLACKHAM, A. and P.S.J. SPENCER:
The effect of estrogens and progestins on the response of mice
to barbiturates
Brit. J. Pharmacol. 37, 129 (1969)
29. BLEDSOE, T., D.P. ISLAND, R.L. NEY, and W.G. LIDDLE:
An effect of o,p'-DDD on the extra-adrenal metabolism of
cortisol in man.
J. clin. Endocr. 24, 1303 (1964)
30. BOCK, K.W., W. FRÖHLING, and H. REMMER:
Influence of fasting and hemin on microsomal cytochromes and enzymes.
Biochem. Pharmacol. 22, 1557 (1973)
31. BOCK, K.W., E. KRAUSS, and W. FRÖHLING:
Regulation of α -aminolevulinic acid synthetase by drugs and
steroids in vivo and in isolated perfused rat liver.
Europ. J. Biochem. 23, 366 (1971)
32. BOOTH, J. and J.R. GILLETTE:
The effect of anabolic steroids on drug metabolism by microsomal
enzymes in rat liver.
J. Pharmacol. exp. Ther. 137, 374 (1962)

33. BRAUN, M., K. HÄUSLER und F. KRIEGER:
Organische Chemie, p 161
München: Bayer. Landwirtschaftsverlag 1967
34. BRAZDA, F.G. and R. BAUCUM:
The effect of nikethamide on the metabolism of pentobarbital by liver microsomes of the rat.
J. Pharmacol. exp. Ther. 132, 295 (1961)
35. BRESNICK, E. and H.Y. LIN:
Effect of phenobarbital administration upon the "soluble" NADP-requiring enzymes in liver.
Fed. Proc. 23, 538 (1964)
36. BRESNICK, E.:
Ribonucleic acid polymerase activity in liver nuclei from rats pretreated with 3-methylcholanthrene.
Molec. Pharmacol. 2, 406 (1966)
37. BREYER, U.:
Perazine, chlorpromazine and imipramine as inducers of microsomal drug metabolism.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 272, 277 (1972)
38. BRIEL, J.E., S.M. Kruckenberg, and E.L. BESCH:
Observations of ammonia generation in laboratory animal quarters.
Publ. 72-03, Institute for Environmental Research, Kansas State Univ., Manhattan 1972
39. BRODIE, B.B. and J.J. AXELROD:
The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl-p-aminophenol and p-aminophenol (free and conjugated) in biological fluids and tissues.
J. Pharmacol. exp. Ther. 94, 22 (1948)
40. BRODIE, B.B., J.R. GILLETTE, and B.N. LA DU:
Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds.
Ann. Rev. Biochem. 27, 427 (1958)
41. BRODIE, B., J.J. BURNS, L.C. MARK, PH.A. LIEF, E. BERNSTEIN, and E.M. PAPPER:
The fate of pentobarbital in man and dog and a method for its estimation in biological material.
J. Pharmacol. exp. Ther. 109, 26 (1953)
42. BUCHEL, L.:
Influence des hormones sexuelles sur l'activité de l'hexobarbital chez le rat. Durée du séjour de cet hypnotique dans l'organisme du rat.
Anesth. Analg. 11, 268 (1954)
43. BURNS, J.J., A.H. CONNEY, and R. KOSTER:
Stimulatory effect of chronic drug administration on drug-metabolizing enzymes in liver microsomes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 881 (1963)

44. BURNS, J.J., S.A. CUCINELL, R. KOSTER, and A.H. CONNEY:
Application of drug metabolism to drug toxicity studies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 123, 273 (1965)
45. BUTLER, J.A.V.:
Effects of x-rays and radiomimetic agents on nucleic acids
and nucleoproteins.
p. 59 in: WOLSTENHOLME, G.E.W. and C.M. O'CONNOR (eds.):
Ciba foundation symposium in ionizing radiations and cell metabolism.
London: Churchill 1956
46. BUZELLO, W., K.L. SCHOLLER und B. SCHÖPPE:
Untersuchungen an Mäusen über die Wirksamkeit verschiedener
Verfahren der Enzyminduktion mit Phenobarbital.
Arzneim. -Forsch. (Drug Res.) 23, 1337 (1973)
47. CATZ, C. and S.J. YAFFE:
Strain and age variations in hexobarbital response.
J. Pharmacol. exp. Ther. 155, 152 (1967)
48. CAVALLI-SFORZA, L.:
Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Stuttgart: Fischer 1972
49. CERAMI, A., E. REICH, D.C. WARD, and J.H. GOLDBERG:
The interaction of actinomycin with DNA requirement for the
2-amino group of purines.
Proc. natl. Acad. Sci. 57, 1036 (1967)
50. CHAPLIN, M.D. and G.J. MANNERING:
Role of phospholipids in the hepatic microsomal drug-metabo-
lizing system.
Molec. Pharmacol. 6, 631 (1970)
51. CHEN, W., P.A. VRINDTEN, P.G. DAYTON, and J.J. BURNS:
Accelerated aminopyrine metabolism in human subjects pre-
treated with phenylbutazone.
Life Sci. 1, 35 (1962)
52. CHHABRA, R.S. and J.R. FOUTS:
Stimulation of hepatic drug-metabolizing enzymes by DDT,
polycyclic hydrocarbons or phenobarbital in adrenalectomized
or castrated mice.
Toxicol. appl. Pharmacol. 28, 465 (1974)
53. COLOMBO, B., L. FELICETTI, and C. BAGLIONI:
Inhibition of protein synthesis by cycloheximide in rabbit
reticulocytes.
Biochem. biophys. Res. Commun. 18, 389 (1965)

54. COMOROSAN, S., S. VIERU, H. GASPAR, and D. SANDRU:
Nucleic acids and protein biosynthesis during alkylating
with triethylene melamine in KB-cells.
Z. Krebsforsch. 71, 113 (1968)
55. CONNEY, A.H.:
Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967)
56. CONNEY, A.H., R.R. BROWN, J.A. MILLER, and E.C. MILLER:
The metabolism of methylated amino azo dyes. VI. intracellular
distribution and properties of the demethylated system.
Cancer Res. 17, 628 (1957)
57. CONNEY, A.H., C. DAVISON, R. GASTEL, and J.J. BURNS:
Adaptive increases in drug metabolizing enzymes induced by
phenobarbital and other drugs.
J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 1 (1960)
58. CONNEY, A.H. and L. GARREN:
Contrasting effects of thyroxine on zoxazolamine and hexo-
barbital metabolism.
Biochem. Pharmacol. 6, 257 (1961)
59. CONNEY, A.H., M. JACOBSON, K. SCHNEIDMAN, and R. KUNTZMAN:
Induction of liver microsomal cortisol 6-hydroxylase by
diphenylhydantoin or phenobarbital: an explanation for the
increased excretion of 6-hydroxycortisol in humans treated
with these drugs.
Life Sci. 4, 1091 (1965)
60. CONNEY, A.H., I.A. MICHAELSON, and J.J. BURNS:
Stimulatory effect of chlorcyclizine on barbiturate metabolism.
J. Pharmacol. exp. Ther. 132, 202 (1961)
61. CONNEY, A.H., E.C. MILLER, and J.A. MILLER:
The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for
induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene.
Cancer Res. 16, 450 (1956)
62. Conney, A.H., E.C. MILLER, and J.A. MILLER:
Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene
hydroxylase in rat liver.
J. biol. Chem. 228, 753 (1957)
63. COOK, L., J.J. TONER, and E.J. FELLOWS:
The effect of β -diethyl-aminoethyldiphenylpropylacetate
hydrochloride (SKF no. 525-A) on hexobarbital.
J. Pharmacol. exp. Ther. 111, 131 (1954)
64. CORLESS, J. and J. GRAY:
Stimulation of cell-free protein synthesis after whole-body
lethal x-irradiation
Radiat. Res. 31, 775 (1967)

65. COX, R., J.T. MARTIN, and H. SHINOZUKA:
Studies on acute methionine toxicity. II. Inhibition of
ribonucleic acid synthesis in guinea pig liver by methionine
and ethionine.
Lab. Invest. 29, 34 (1973)
66. CRAMER, J.W., J.A. MILLER, and E.C. MILLER:
The hydroxylation of the carcinogen 2 -acetylaminofluorene
by rat liver: Stimulation by pretreatment in vivo with
3 -methylcholanthrene.
J. biol. Chem. 235, 250 (1960)
67. CUCINELL, S.A., L. ODESSKY, M. WEISS, and P.G. DAYTON:
The effect of chloral hydrate on bishydroxycoumarin
metabolism.
J. Amer. med. Ass. 197, 366 (1967)
68. CULLEN, S.I. and P.M. CATALANO:
Griseofulvin-warfarin antagonism.
J. Amer. med. Ass. 199, 150 (1967)
69. DAVIES, D.S., P.L. GIGON, and J.R. GILLETTE:
Species and sex differences in electron transport systems
in liver microsomes and their relationship to ethylmorphine
demethylation.
Life Sci. 8, II, 85 (1969)
70. DAVIES, L.W., J.A. BROWN, and T.A. STRIKE:
Effectiveness of drugs in animals exposed to mixed gamma-
neutrone radiations. V. Barbiturates.
AFPRIsCi. Rep. SR 68-19 (1968)
71. DAVIS, W.M.:
Day-night periodicity in pentobarbital response of mice and
the influence of socio-psychological conditions.
Experientia 18, 235 (1962)
72. DEHLINGER, P.J. and R.T. SCHIMKE:
Effects of phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and hematin
on the synthesis of protein components of rat liver micro-
somal membranes.
J. biol. Chem. 247, 1257 (1972)
73. DERTINGER, H. und H. JUNG:
Molekulare Strahlenbiologie.
Berlin: Springer 1969
74. DINGELT, J.V. and J.R. GILLETTE: (unpubl.)
Zit. von REMMER: 297
75. DINGSMAN, C.W. and M.B. SPORN:
Actinomycin D and hydrocortisone: intracellular binding in
rat liver.
Science 149, 1251 (1965)

76. DIXON, R.L. and J.R. FOUTS:
Inhibition of microsomal drug metabolic pathways by
chloramphenicol.
Biochem. Pharmacol. 11, 715 (1962)
77. DIXON, R.L., R.W. SHULTICE, and J.R. FOUTS:
Factors affecting drug metabolism by liver microsomes.
IV. Starvation.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 333 (1960)
78. DONELLI, M.G., S. COLOMBO, and S. GARATTINI:
Experiments aiming at demonstrating microsomal
drug metabolism in the tumor tissue.
Europ. J. Cancer 8, 181 (1972)
79. DONELLI, M.G. and S. GARATTINI:
Drug metabolism after repeated treatments with
cytotoxic agents.
Europ. J. Cancer 7, 361 (1971)
80. DOUGLAS, J.F., B.J. LUDWIG, B.J. SMITH,
Studies on the metabolism of meprobamate.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 112, 436 (1963)
81. DUSTIN, F.:
Some new aspects of mitotic poisoning.
Nature 159, 794 (1947)
82. DUTTON, G.J.:
The biosynthesis of glucuronides. In: Glucuronic Acid,
chap. 3, p. 185
New York: Academic 1966
83. EICHHOLTZ, F., R. HOTOVY, P. COLLISCHONN und H. KNAUER:
Beeinflussung der Entgiftungszeiten von Avertin und
Pentothal-Natrium an der nebennierenlosen Ratte durch
Nebennieren-Rindenhormon
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 207, 576 (1949)
84. EHRHART, G. und H. RUSCHIG:
Arzneimittel: Entwicklung, Wirkung, Darstellung.
Band 5, p. 369
Weinheim: Verlag Chemie 1972
85. ELKIND, M.M.:
Sublethal x-ray damage and its repair in mammalian cells. p. 558
in: Radiation Research, Proceedings of the 3. Internat.
Congr. of Rad. Research held at Cortina d' Ampezzo, 1966
Amsterdam: North Holland 1967
86. ENNIS, H.L. and M. LUBIN:
Cycloheximide: aspects of inhibition of protein synthesis in
mammalian cells.
Science 146, 1474 (1964)

87. ERNSTER, L. and S. ORRENIUS:
Substrate-induced synthesis of the hydroxylating enzyme system
of liver microsomes.
Fed. Proc. 24, 1190 (1965)
88. ESSER, R. and H. REMMER: (unpubl.)
Zit. von: REMMER 298
89. ESTABROOK, R.W., D.Y. COOPER, and O. ROSENTHAL:
The light reversible monoxide inhibition of the steroid
C21 α -hydroxylase system of the adrenal cortex.
Biochem. Z. 338, 741 (1963)
90. ESTABROOK, R.W., J.R. GILLETTE, and K.C. LEIBMAN:
Microsomes and drug oxidations.
(Second internat. Symp. 29. - 31.7.72, Stanford Univ. Stanf. Kalif.)
Baltimore: Williams & Wilkins 1973
91. ESTABROOK, R.W., A. HILDEBRANDT, H. REMMER, J.B. SCHULMAN,
O. ROSENTHAL, and D.Y. COOPER:
The role of cytochrome P-450 in microsomal mixed function
oxidation reactions.
p. 142 ff. in: B. HESS u. H.J. STAUDINGER (eds.): Biochemie des
Sauerstoffs.
Heidelberg: Springer 1968
92. FARBER, E.:
Ethionine fatty liver.
Adv. Lipid Res. 5, 119 (1967)
93. FARBER, E., B. LOMBARDI, and A.E. CASTILLO:
The prevention by adenosine triphosphate of the fatty liver
induced by ethionine.
Lab. Invest. 12, 873 (1963)
94. FARBER, E., K.H. SHULL, S. VILLA-TREVINO, B. LOMBARDI, and M. THOMAS:
Biochemical pathology of acute hepatic adenosine triphosphate de-
ficiency.
Nature 203, 34 (1964)
95. FARBER, J.L. and R. FARMAR:
Differential effects of cycloheximide on protein and RNA
synthesis as a function of dose.
Biochem. biophys. Res. Commun. 51, 626 (1973)
96. FAWCETT, D.W.:
Atlas zur Elektronenmikroskopie der Zelle. (p. 163 ff.)
München: Urban & Schwarzenberg 1973
97. FEINE, U.:
Radiomimetische Stoffe, p.943 in Strahlenbiologie, Strahlentherapie,
Nuklearmedizin und Krebsforschung, Ergebnisse 1952-1958.
Stuttgart: Thieme 1959

98. FEINSTEIN, R.N. and J.C. BALLIN:
Effect of whole-body x-irradiation on a natural inhibitor
of carboxypeptidase.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 83, 6 (1953)
99. FELICETTI, L. and F. LIPMANN:
Comparison of amino acid polymerisation factors isolated from
rat liver and rabbit reticulocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 125, 548 (1968)
100. FERGUSON, H.C.:
Effect of red cedar chip bedding on hexobarbital and
pentobarbital sleep time.
J. pharm. Sci. 55, 1142 (1966)
101. FLEMMING, K.:
Neue Befunde über die Nebennierenrinden-Aktivität bei ganz-
körperbestrahlten Ratten.
Strahlentherapie 137, 82 (1969)
102. FLORKIN, M. and E.H. STOTZ (eds.)
Comprehensive Biochemistry, Vol. 13
Amsterdam: Elsevier 1964
103. FOUTS, J.R.:
Physiological impairment of drug metabolism.
p. 257 ff. in: BRODIE B.B. and E.C. ERDOS (eds.):
Metabolic factors controlling duration of drug action.
Oxford: Pergamon 1962
104. FOUTS, J.R.:
Some effects of insecticides on hepatic microsomal enzymes
in various animal species.
Rev. Can. Biol. 29, 377 (1970)
105. FOUTS, J.R.:
Some selected studies on hepatic microsomal drug-metabolizing
enzymes-environment interactions.
In: 2nd Intern. Symp. Microsomes and Drug Oxidations
Eds.: ESTABROOK, R.W., J.R. GILLETTE, K.C. LEIBMANN
Baltimore: Williams & Wilkins 1972
106. FOUTS, J.R. and R.H. ADAMSON:
Drug metabolism in the newborn rabbit.
Science 129, 897 (1959)
107. FOUTS, J.R. and L.A. ROGERS:
Morphological changes in the liver accompanying stimulation of
microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital,
chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats.
J. Pharmacol. exp. Ther. 147, 112 (1965)
108. FRACCARO, M., A. MANNINI, L. TIEPOLO, and A. ALBERTINI:
Incorporation of tritiumlabelled actinomycin in a human
cell line.
Exp. Cell Res. 43, 136 (1966)

109. FRANKLIN, T.J. and G.A. SNOW:
Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe.
Berlin: Springer 1973
110. FREUDENBERG, H. and J. MAGER:
Studies on the mechanism of the inhibition of protein
synthesis induced by intracellular ATP depletion.
Biochim. biophys. Acta 232, 537 (1971)
111. FUJIMOTO, J.M. and G.L. PLAA:
Effect of ethionine and carbon tetrachloride on urethan
and phenobarbital induced changes in hexobarbital action.
J. Pharmacol. exp. Ther. 131(3), 282 (1961)
112. GALE, E.F., E. CUNDLIFFE, P.E. REYNOLDS, M.H. RICHMOND,
and M.J. WARING:
The molecular basis of antibiotic action.
London: Wiley 1972
113. GARG, B.D., K. KOVACS, J.A. BLASCHECK, and H. SELYE:
Ultrastructural changes induced by pregnenolone nitrile
in the rat liver.
J. Pharm. Pharmacol. 22, 872 (1970)
114. GARG, B.D., S. SZABO, J.D. KHANDEKAR, and K. KOVACS:
Effect of hypophysectomy on pregnenolone-16 α -carbo-
nitrile-induced ultrastructural changes in rat liver.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 269, 7 (1971)
115. GELBOIN, H.V. and N.R. BLACKBURN:
The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on
benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues.
Inhibition by actinomycin D and puromycin.
Cancer Res. 24, 356 (1964)
116. GELBOIN, H.V., L.R. YOUNGER, D.W. NEBERT, and J.M. MILLER:
In vivo and in vitro studies on the mechanism of microsomal
enzyme induction.
In: Proc. 4th Intern. Congr. Pharmacol., July, 1969, Basel, p.287
117. GHAZAL, A., W. KORANSKY, J. PORTIG, H.W. VOHLAND, and I. KLEMPAU:
Beschleunigung von Entgiftungsfunktionen durch verschiedene
Insektizide.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 249, 1 (1964)
118. GILLETTE, J.R.:
Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic
mechanisms.
Progr. Drug Res. 6, 11 (1963)
119. GILLETTE, J.R.:
Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in
hepatic endoplasmic reticulum.
p. 219 ff. in: GARATTINI, S. and P.A. SHORE (eds.):
Advances in Pharmacology.
New York: Academic 1966

120. GILLETTE, J.R.:
Individually different responses to drugs according to age, sex, and functional or pathological state..
In: WOLSTENHOLME G.E.W. & PORTER R. (eds.)
Drug responses in man, pp. 24-49
London: J.&A. Churchill 1967
121. GILLETTE, J.R.:
Aspects of drug metabolism relating to pharmacologic activity.
Amer. J. Pharm. 141, 64 (1969)
122. GILMAN, A.G. and A.H. CONNEY:
The induction of aminoazo dye N-demethylase in nonhepatic tissues by 3-methylcholanthrene.
Biochem. Pharmacol. 12, 591 (1963)
123. GIGON, P.L., T.E. GRAM, and J.R. GILLETTE:
Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.
Molec. Pharmacol. 5, 109 (1969)
124. GILLETTE, J.R., A.H. CONNEY, G.J. COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J.R. FOUTS, and G.J. MANNERING:
Microsomes and drug oxidations. Symp. on microsomes and drug oxidations, Bethesda, 1968, p. 547
New York: Academic 1969
125. GLASER, G. and J. MAGER:
Biochemical studies on the mechanism of action of liver poisons. II. Induction of fatty livers.
Biochim. biophys. Acta 261, 500 (1972)
126. GLASER, G. and J. MAGER:
Biochemical studies on the mechanism of action of liver poisons. Inhibition of protein synthesis.
Biochim. biophys. Acta 261, 487 (1972)
127. GODCHAUX, W., S.D. ADAMSON, and E. HERBERT:
Effects of cycloheximide on polyribosome function in reticulocytes.
J. mol. Biol. 27, 57 (1967)
128. GOLDBERG, J.H.:
Mode of action of antibiotics. II. Drugs affecting nucleic acid and protein synthesis.
Amer. J. Med. 39, 722, (1965)
129. GOLDBERG, J.H., M. RABINOWITZ, and E. REICH:
Basis of actinomycin action: I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin.
Proc. natl. Acad. Sci. 48, 2094 (1962)
130. GOLDBERG, J.H. and E. REICH:
Actinomycin inhibition of RNA synthesis directed by DNA.
Fed. Proc. 23, 958 (1964)

131. GRAM, T.E. and J.R. FOUTS:
Time course differences in the metabolism of drugs by hepatic microsomes from rats, rabbits and mice.
J. Pharmacol. exp. Ther. 152, 363-371 (1966)
132. GRAM, T.E., L. ROGERS, and J.R. FOUTS:
Further studies on the metabolism of drugs by subfractions of hepatic microsomes.
J. Pharmacol. exp. Ther. 155, 479 (1967)
133. GRAM, T.E., J.T. WILSON, and J.R. FOUTS:
Some characteristics of hepatic microsomal systems which metabolize aminopyrine in the rat and rabbit.
J. Pharmacol. exp. Ther. 159, 172 (1968)
134. GREENGARD, O.:
Specific enzyme responses in starved, glucagon-treated or irradiated rats, and general considerations on the mechanisms of induction in animals.
Adv. Enzyme Reg. 5, 397-405 (1967)
135. RICHARDSON, H.L., A.R. STIER, and E. BORSOS-NACHTNEBEL:
Liver tumor inhibition and adrenal histologic responses in rats to which 3'-methyl-4-dimethylamino azobenzene and 20-methylcholanthrene were simultaneously administered.
Cancer Res. 12, 356 (1952)
136. GREIM, H. and H. REMMER:
Die Wirkung von DDT und Phenobarbital auf mikrosomale hydroxylierende Cytochrome.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. exp. Path. 255, 16 (1966)
137. GREIM, H. and H. REMMER:
Induction of microsomal hemoprotein-synthesis by phenobarbital.
p. 340 ff in: Proc. 4th int. Congr. pharmacol., Basle 1969, Band IV
Basel: Schwabe 1970
138. GREIM, H. and H. REMMER:
Stabilisation of heme during the elevation of microsomal cytochromes P-450 and b-5 by phenobarbital in starved rats.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 25, 113 (1970)
139. GREIM, H., J.B. SCHENKMAN, M. KLOTZBÜCHER, and H. REMMER:
The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b-5 and cytochrome P-450 hemes in the rat.
Biochim. biophys. Acta 201, 20 (1970)
140. GROLLMAN, A.P.:
Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analog between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics.
Proc. natl. Acad. Sci. 56, 1867 (1966)

141. GRÜBNER, J., W. KLINGER, und H. ANKERMANN:
Untersuchung verschiedener Stoffe und Stoffklassen auf
Induktoreigenschaften. II.
Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 196, 288 (1972)
142. GUARINO, A.M., T.E. GRAM, P.L. GIGON, F.E. GREENE, and
J.R. GILLETTE:
Changes in Michaelis and spectral constants for aniline
in hepatic microsomes from phenobarbital-treated rats.
Molec. Pharmacol. 5, 131 (1969)
143. HAMILTON, L.D., W. FULLER, and E. REICH:
X-ray diffraction and molecular model: building studies
of the interaction of actinomycin with nucleic acids.
Nature 198, 538 (1963)
144. HANSEN, A.R. and J.R. FOUTS:
A comparison of the effects of benzpyrene administration
on some hepatic microsomal mixed-function oxidases of
rats and mice.
Biochem. Pharmacol. 20, 3125 (1971)
145. HASELKORN, R.:
Actinomycin D as a probe for nucleic acid secondary structure.
Science 143, 682 (1964)
146. HARBERS, E. and W. MÜLLER:
On the inhibition of RNA synthesis by actinomycin.
Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 107 (1962)
147. HARBERS, E., W. MÜLLER, und R. BACKMANN:
Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Actinomycine.
II. Versuche mit C14-Actinomycin und Ehrlich-Ascites-
Tumorzellen in vitro.
Biochem. Z. 337, 224 (1963)
148. HARTL, L.G. and J.R. FOUTS:
Effects of acute and chronic DDT- administration on hepatic
microsomal drug metabolism in the rat.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 114, 388 (1963)
149. HART, L.G., R.W. SHULTICE, and J.R. FOUTS:
Stimulatory effects of chlordane on hepatic microsomal drug
metabolism in the rat.
Toxicol. appl. Pharmacol. 5, 371 (1963)
150. HARTMAN, H.A. and A.J. TOUSIMIS:
Rat hepatocyte peroxisomes: Ultrastructural alterations
following cessation of chronic dietary clofibrate administration.
Experientia 25, 1248 (1969)
151. HAYAISHI, O.:
General properties and biological functions of oxygenases.
in: HAYAISHI, O. (ed.):
Molecular mechanisms of oxygen activation.
New York: Academic 1974

152. HENDERSON, T.R. and R.K. JONES:
Tyrosine aminotransferase induction in rat liver as a response
to irradiation and/or flash burn injuries.
DNA sci. Rep. 3001 T oct. 1972
153. HERSHKO, A., P. MAMONT, R. SHIELDS, and G.M. TOMKINS:
Pleiotypic response.
Nature 232, 206 (1971)
154. HEUBEL, F.:
Interferenz von Diazepam und Pentobarbital an der Ratte und
am Menschen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 264, 246 (1969)
155. HIDVEGI, E.J., E.BÖLÖNI, J. HOLLAND, F. ANTONI, and V. VARTERESZ:
The effect of whole-body x-irradiation of guinea pigs on
liver ribonucleic acid synthesis.
Biochem. J. 116, 503 (1970)
156. HIDVEGI, E.J., J. HOLLAND, E. BÖLÖNI, P. LONAI, F. ANTONI,
and V. VARTERESZ:
The effect of whole-body x-irradiation of guinea pigs on
liver ribosomes.
Biochem. J. 109, 495 (1968)
157. HILDEBRANDT, A., H. REMMER, and R.W. ESTABROOK:
Cytochrome P-450 of liver microsomes - one pigment or many.
Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 607 (1968)
158. HILTON, J. and A.C. SARTORELLI:
Induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in
regenerating liver.
Adv. Enzyme Reg. 8, 153 (1970)
159. HILTON, J. and A.C. SARTORELLI:
The effect of x-irradiation on the induction of aniline
hydroxylase by phenobarbital in partially hepatectomized rats.
Biochim. biophys. Acta 237, 107 (1971)
160. HÖLZEL, F., H. HEBBELN, E. HÖCKE und H. MAASS:
Die Penetration und die intracelluläre Verteilung von Trenimon,
p-Benzochinon, Actinomycin und Tri-äthylenmelamin bei in vitro-
Untersuchungen mit Ehrlich-Ascitestumorzellen.
Z. Krebsforsch. 70, 74 (1967)
161. HOLCK, H.G.O., M.A. KANAN, L.M. MILLS, and E.L. SMITH:
Studies upon the sex-differences in rats in tolerance to
certain barbiturates and to nicotine.
J. Pharmacol. exp. Ther. 60, 1 (1937)
162. HOLTZMAN, J.L., T.E. GRAM, P.L. GIGON, and J.R. GILLETTE:
The distribution of the components of mixed-function oxidase
between the rough and the smooth endoplasmic reticulum of
liver cells.
Biochem. J. 110, 407 (1968)

163. HOOGLAND, D.R., T.S. MIYA, and W.F. BOUSQUET:
Metabolism and tolerance studies with chlordiazepoxide-2-¹⁴C
in the rat.
Toxicol. appl. Pharmacol. 9, 116 (1966)
164. HOOK, G.E.R., J.R. BEND, D. HOEL, J.R. FOUTS, and T.E. GRAM:
Preparation of lung microsomes and a comparison of the
distribution of enzymes between subcellular fractions of
rabbit lung and liver.
J. Pharmacol. exp. Ther. 182, 474 (1972)
165. HOPKINSON, J. and Th.S. ARGYRIS:
Changes in ribonucleic acid metabolism associated with
3-methylcholanthrene-induced adult rat liver growth.
Lab. Invest. 29, 342 (1973)
166. IMAI, Y. and R. SATO:
Importance of an acetone-soluble fraction in aromatic
hydroxylation by liver microsomes.
Biochim. biophys. Acta 36, 571 (1959)
167. IMAI, Y. and R. SATO:
Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in microsomal
membranes.
Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 5 (1966)
168. JACOB, F. and J. MONOD:
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.
J. mol. Biol. 3, 318 (1961)
169. JAY, G.E. jr.
Variation in response of various mouse strains to
hexobarbital (Evipal).
Proc. Soc. exp. Biol. 90, 378 (1955)
170. JONDORF, W.R., R.P. MAICKEL, and B.B. BRODIE:
Inability of newborn mice and guinea pigs to metabolize drugs.
Biochem. Pharmacol. 1, 352 (1958)
171. JORI, A., C. OUGLIATTI, and V. SANTINI:
Differences in microsomal enzyme induction between
Sprague-Dawley and Long-Evans rats.
Pharmacology 7(5/6) 296 (1972)
172. JUCHAU, M.R., J.R. FOUTS:
Effects of norethynodrel and progesterone on hepatic micro-
somal drug metabolizing enzyme systems.
Biochem. Pharmacol. 15, 891 (1966)
173. KANAZIR, D.:
Radiation induced alterations in the structure of deoxy-
ribonucleic acid and their biological consequences.
Progr. Nucl. Acid Res. mol. Biol. 9, 117 (1969)

174. KANEKO, A., S. SAKAMOTO, M. MORITA, and T. ONOE:
Morphological and biochemical changes in rat liver in early stages of ethyl chlorophenoxyisobutyrate administration.
Tohoku J. exp. Med. 99, 81 (1969)
175. KASCHNITZ, R.:
Aryl 4-hydroxylase, cytochrome P-450 and microsomal lipids in essential fatty acid deficiency.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 771 (1970)
176. KATO, R.:
Un trattamento, eseguito 48 ore prima, con syriate sostanze può diminuire gli effetti farmacologici del nembutal.
Atti Soc. Lomb. Sci. med. biol. 14, 778 (1959)
177. KATO, R.:
Induced increase of meprobamate metabolism in rats treated with phenobarbital or phenaglycodol.
Med. exp. 3, 95 (1960)
178. KATO, R.:
Effects of starvation and refeeding on the oxidation of drugs by liver microsomes.
Biochem. Pharmacol. 16, 871 (1967)
179. KATO, R., E. CHIESARA, and P. VASSANELLI:
Increased activity of microsomal strychnine-metabolizing enzyme induced by phenobarbital and other drugs.
Pharmacology 11, 913 (1962)
180. KATO, R. and E. CHIESARA:
Increase of pentobarbitone metabolism induced in rats pretreated with some centrally acting compounds.
Brit. J. Pharmacol. 18, 29 (1962)
181. KATO, R., E. CHIESARA, and P. VASSANELLI:
Factors influencing induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes.
Biochem. Pharmacol. 11, 211 (1962)
182. KATO, R. and J.R. GILLETTE:
Sex differences in the effects of starvation, alloxan diabetes and morphine on the metabolism of drugs by rat liver microsomes.
Pharmacology 5, 240 (1963)
183. KATO, R. and J.R. GILLETTE:
Effect of starvation on NADPH- dependent enzymes in liver microsomes of male and female rats.
J. Pharmacol. exp. Ther. 150, 279 (1965)

184. KATO, R. and J.R. GILLETTE:
Differences in the effects of starvation and sucrose feeding
on TPNH- dependent enzymes in liver microsomes of rats.
Fed. Proc. 23, 538 (1964)
185. KATO, R. and J.R. GILLETTE:
Sex differences in the effects of abnormal physiological
states on the metabolism of drugs by rat liver microsomes.
J. Pharmacol. exp. Ther. 150, 285 (1965)
186. KATO, R., W.R. JONDORF, L.A. LOEB, T. BEN, and H.V. GELBOIN:
Studies on the mechanism of drug induced microsomal enzyme
activities. V. Phenobarbital stimulation of endogenous messenger
RNA and polyuridylic acid directed L-(¹⁴C)-phenylalanine
incorporation.
Molec. Pharmacol. 2, 171 (1966)
187. KATO, R., T. OSHIMA, and S. TOMIZAWA:
Toxicity and metabolism of drugs in relation to dietary
protein.
Jap. J. Pharmacol. 18, 356 (1968)
188. KATO, R. and A. TAKANAKA:
Metabolism of drugs in old rats (II).
Metabolism in vivo and effect of drugs in old rats.
Jap. J. Pharmacol. 18, 389 (1968)
189. KATO, R. and A. TAKANAKA:
Metabolism of drugs in old rats (I). Activities of NADPH-
linked electrontransport and drug-metabolizing enzyme
systems in liver microsomes of old rats.
Jap. J. Pharmacol. 18, 381 (1968)
190. KATO, R., A. TAKANAKA, and K.J. ONODA:
Studies on age difference in mice for the activity of drug
metabolizing enzymes of liver microsomes.
Jap. J. Pharmacol. 20, 572 (1970)
191. KATO, R., A. TAKANAKA, A. TAKAHASHI, and K. ONODA:
Species differences in the alteration of drug metabolizing
activities of liver microsomes by thyroxine treatment.
Jap. J. Pharmacol. 19, 5 (1969)
- 192a. KATO, R. and P. VASSANELLI:
Induction of increased meprobamate metabolism in rats
pretreated with some neurotropic drugs.
Biochem. Pharmacol. 11, 779 (1962)
- 192b. KATO, R., P. VASSANELLI, G. FRONTINO, and E. CHIESARA:
Variation in the activity of liver microsomal drug-metabo-
lizing enzymes in rats in relation to the age.
Biochem. Pharmacol. 13, 1037 (1964)

193. KAWAMATA, J. and M. ISMANISHI:
Interaction of actinomycin with deoxyribonucleic acid.
Nature 187, 1112 (1960)
194. KAWAMATA, J. and M. ISMANISHI:
Mechanism of action of actinomycin, with special reference to
its interaction with deoxyribonucleic acid.
Biken J. 4, 13 (1961)
195. KAWAMATA, J., M. OKUDAIRA, and Y. AKAMATSU:
Autoradiographic studies on the intracellular distribution
of H³-actinomycin S in TG cells.
Biken J. 8, 119 (1965)
196. KENNEY, F.T.:
Turnover of rat liver tyrosine transaminase: Stabilization
after inhibition of protein synthesis.
Science 156, 525 (1967)
197. KENNEY, F.T.:
Turnover of rat liver tyrosine transaminase in vivo:
Inhibition by protein synthesis-inhibitors.
Fed. Proc. 26, 347 (1967)
198. KERRIDGE, D.:
The effect of actidione and other antifungal agents on
nucleic acid and protein synthesis in *saccharomyces*
Carlsbergensis.
J. gen. Microbiol. 19, 497 (1958)
199. KERSTEN, H.H. and W. KERSTEN:
Inhibitors acting on DNA and their use to study DNA replication
and repair. 20. Colloqu. Ges. Biol. Chem. p. 11 ff.
Berlin: Springer 1969
200. KERSTEN, W.:
Interaction of actinomycin C with constituents of nucleic
acids.
Biochim. biophys. Acta 47, 610 (1961)
201. KINOSHITA, F.K., J.P. FRAWLEY, and K. DU BOIS:
Quantitative measurement of induction of hepatic microsomal
enzymes by various dietary levels of DDT and toxaphene in rats.
Toxicol. appl. Pharmacol. 9, 505 (1966)
202. KONOSHITA, T. and S. HORIE:
Studies on P-450. III. On the absorption spectrum of P-450 in
rabbit liver microsomes.
J. Biochem. 61, 26 (1967)
203. KIRK, J.M.:
The mode of action of actinomycin D.
Biochim. biophys. Acta 42, 167 (1960)

204. KISILEVSKY, R.:
The regulatory parameter of protein synthesis most affected by ethionine and cycloheximide. A comparison of computer and in vivo studies.
Biochim. biophys. Acta 272, 463 (1972)
205. KLINGENBERG, M.:
Pigments of rat liver microsomes.
Arch. Biochem. 75, 376 (1958)
206. KNOTT, J.C.A. and E.D. WILLS:
Effects of whole-body irradiation and hormones on drug metabolism in the liver endoplasmic reticulum.
Radiat. Res. 53, 65 (1973)
207. KNOTT, J.C.A. and E.D. WILLS:
The role of testosterone in the regulation of oxidative drug metabolism in normal and irradiated animals.
Biochem. Pharmacol. 23, 793 (1974)
208. KOCSIS, J.J., S. HARKAWAY, M.C. SANTOYO, and R. SNYDER:
Dimethyl sulfoxide: Interactions with aromatic hydrocarbons.
Science 272, 463 (1972)
209. KÖNIG, K., P. STÄHLER, H. BAISCH, and R. VÖLCKER:
Incorporation of tritium-uridine in RNA of the isolated perfused rat liver after irradiation in vitro.
1. Europ. Biophys. Congr.
Proc. 1. Europ. biophys. Congr. 2, 293 (1971)
210. KORANSKY, W. und J. PORTIG:
Der Stoffwechsel der Hexachlorcyclohexan-Isomeren und seine Beeinflussung durch mikrosomenaktivierende Pharmaka.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 243, 294 (1962)
211. KORANSKY, W., J. PORTIG, H.W. VOHLAND und I. Klempaus:
Aktivierung von Mikrosomenenzymen durch Hexachlorcyclohexan-Isomere.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 255, 16 (1966)
212. KORANSKY, W. and R. SCHULTE-HERMANN:
Induction of cell proliferation in the liver by drugs.
In: Proc. 4th Intern. Congr. Pharmacol. p.277
Basel: 1969
213. KÖRNER, A.:
Effect of cycloheximide on protein biosynthesis in rat liver.
Biochem. J. 101, 627 (1966)
214. KRAUSE, W.:
Die Steigerung der Aktivität oxydierender Enzyme in den Lebermikrosomen durch Arzneimittel.
Med. Diss., Berlin 1962

215. KUNTZMANN, R., M. JACOBSON, W. LEVIN, and A.H. CONNEY:
Stimulatory effect of N-phenylbarbital (phetharbital)
on cortisol hydroxylation in man.
Biochem. Pharmacol. 17, 565 (1968)
216. KUNZ, W., G. SCHAUDE, W. SCHMID und M. SIESS:
Lebervergrößerung durch Fremdstoffe.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. exp. Path. 254, 470 (1966)
217. KUNZ, W. and B. SCHNIEDERS:
RNA metabolism and induction of extramicrosomal enzymes
during liver enlargement due to drugs. In: *Proc. 4th
Internat. Congr. Pharmacol.* p. 326
Basel: 1969
218. KUPFER, D., T. BALAZS, and D.A. BUYSKE:
Stimulation of o,p'-DDD on cortisol metabolism in the
guinea pig.
Life Sci. 3, 959 (1964)
219. KUMMER, D. und H.D. OCHS:
Differenzierung der Wirkungsmechanismen alkylierender
Cytostatica an Ehrlich-Ascitescarcinom- und lymphatischen
Leukämiezellen.
Z. Krebsforsch. 73, 315 (1970)
220. KURIYAMA, Y., T. OMURA, P. SIEKEVITZ, and G.E. PALADE:
Effects of phenobarbital on the synthesis and degradation
of the protein components of rat liver microsomal membranes.
J. biol. Chem. 244, 2017-2026 (1968)
221. KVASNICKOVÁ, E., K. LEJSEK, and J.M. HAYS:
Decrease in pethidine demethylating activity of isolated
rat liver microsomes following whole-body x-irradiation.
Experientia 27, 130 (1971)
222. KVASNICKOVÁ, E., K. LEJSEK, and J.M. HAYS:
Impairment of rat hepatic microsomal demethylating activity and
structural protein after x-irradiation of the head.
Biochem. Pharmacol. 22, 275 (1973)
223. LA DU, B.N., L. GAUDETTE, N. TROUSOF, and B.B. BRODIE:
Enzymatic dealkylation of aminopyrin and other alkylamines.
J. biol. Chem. 244, 741 (1955)
224. LAWLEY, P.D. and P. BROOKES:
Interstrand cross-linking of DNA by bifunctional alkylating
agents.
J. mol. Biol. 25, 143 (1967)
225. LECHNER, M.C. and C.R. POUSADA:
A possible role of liver microsomal alkaline ribonuclease in
the stimulation of oxidative drug metabolism by phenobarbital,
chlordane and chlorphenothane.
Biochem. Pharmacol. 20, 3021 (1971)

226. LEJSEK, K., E. KVASNÍČKOVÁ, and I.M. HAIS:
Microsomal structural protein after x-irradiation.
Biochim. biophys. Acta 221, 680 (1970)
227. LIN, S., R.D. MOSTELLER, and B. HARDESTY:
The mechanism of sodium fluoride and cycloheximide inhibition of hemoglobin biosynthesis in the cell-free reticulocyte system.
J. mol. Biol. 21, 51 (1969)
228. LINEWEAVER, H. and D. BURK:
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934)
229. LITTERST, C.L. and E.J. VAN LOON:
Enzyme Induction by polychlorinated biphenyls relative to known inducing agents.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 141(3), 765 (1972)
230. LODISH, H.F., D. HOUSMAN, and M. JACOBSEN:
Initiation of hemoglobin synthesis: specific inhibition by antibiotics and bacteriophage ribonucleic acid.
Biochemistry 10, 2348 (1971)
231. LOMBARDI, B.:
Considerations of the pathogenesis of fatty liver.
Lab. Invest. 15, 1 (1966)
232. LOMBARDI, B. and G. UGAZIO:
Serum lipoproteins in rats with carbon tetrachloride-induced fatty liver.
J. Lipid Res. 6, 498 (1965)
233. LONG, R.F.:
Induction of drug-metabolizing enzymes and cytochrome P-450.
Biochem. J. 115, 26 (1969)
234. LOUIS-FERDINAND, R.T. and G.C. FULLER:
Suppression of hepatic ribonuclease during phenobarbital stimulation of drug metabolism.
Biochem. biophys. Res. Comm. 38, 811 (1970)
235. LOUIS-FERDINAND, R.T. and G.C. FULLER:
Induction of liver microsomal drug metabolism and inhibition of microsomal ribonuclease activity by phenobarbital.
Toxicol. appl. Pharmacol. 23, 492 (1972)
236. LUNDIN, L.G.:
Genetical variations of hydrolases in the mouse.
Med. Diss., Uppsala 1970

237. MAASS, H., L. BUDDE, F. HÖLZEL und R. SCHWENKE:
Die Einwirkung von Triäthyleniminobenzochinon auf die DNS-
Synthese, den NAD- und NADP- Gehalt der regenerierenden
Rattenleber.
Z. Krebsforsch. 68, 326 (1966)
238. MAASS, H., G. HÖHNE und H.A. KÜNKEL:
Über die Strahlenempfindlichkeit von Enzymen der Ratten-
leber.
Z. Naturforsch. 116, 593 (1956)
239. MAASS, H. und D.R. RÜHLE:
Die Wirkung von Actinomycin und Trisäthyleniminobenzochinon
auf die DNS- Synthese in regenerierender Rattenleber.
Z. Krebsforschung 74, 304 (1970)
240. MC LEAN, A.E.M. and E.K. MC LEAN:
The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)
ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensi-
vity of rats to carbon tetrachloride poisoning.
Biochem. J. 100, 564 (1966)
241. MC LEAN, A.E.M. and E.K. MC LEAN:
Diet and toxicity.
Br. med. Bull. 25, 278 (1969)
242. MC LEOD, S.M., K.W. RENTON, and N.R. BADE:
Development of hepatic microsomal drug-oxidizing enzymes in
immature male and female rats.
J. Pharmacol. exp. Ther. 183, 489 (1972)
243. MC MAHON, D.:
Cycloheximid is not a specific inhibitor of protein synthesis.
Fed. Proc. 30, 1112 (1971)
244. MAGEE, P.N.:
Alkylation of nucleic acids and carcinogenesis. p. 79 in:
17. Colloqu. d. Ges. f. physik. Chemie am 21./23. April 1966
in Mosbach.
Berlins: Springer 1966
245. MANNERING, G.J.:
Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism.
In: Fundamentals of drug metabolism and disposition
(ed. LA DU et al.).
Baltimore: Williams & Wilkins 1971
246. MARSHALL, W.J. and A.E.M. MC LEAN:
The effect of nutrition and hormonal status on cytochrome P-450
and its induction.
Biochem. J. 115, 27 P (1969)

247. MARSHALL, W.J. and A.E.M. MC LEAN:
A requirement for dietary lipids for induction of cytochrome P-450 by phenobarbitone in rat liver microsomal fraction.
Biochem. J. 122, 569 (1971)
248. MARVER, H.S.:
The role of heme in the sythesis and repression of microsomal protein.
In: J. GILLTEETE, A.H. CONNEY, G.J. COSMIDES, R.W. ESTABROOK, J. R. FOUTS, and G.J. MANNERING (eds.):
Microsomes and drug oxidations.
New York: Academic 1969
249. MILLER, E.C., J.A. MILLER, and R.R. BROWN:
On the inhibitory action of certain polycyclic hydrocarbons on azo dye carcinogenesis.
Cancer Res. 12, 282 (1952)
250. MUNRO, H.N., B.S. BALIGA, and A.W. PRONCZUK:
In vitro inhibition of peptide synthesis and GTP hydrolysis by cycloheximide and reversal of inhibition by glutathione.
Nature 219, 944 (1968)
251. NAIR, V.:
Modifikation of pharmacological activity following x-irradiation.
Radiat. Res. 30, 359 (1967)
252. NAIR, V. and D. BAU:
Inhibition of a hepatic microsomal enzyme system after head x-irradiation of rats.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 126, 853 (1967)
253. NAIR, V., D. BAU, and S. SIEGEL:
Effects of prenatal x-irradiation: Studies on the mechanism of x-irradiation-induced inhibition of microsomal enzyme development in rat liver.
Radiat. Res. 36, 493 (1968)
254. NAIR, V., S. FINER and D. SHAH:
Interactive effects of x-irradiation and barbiturates.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 120, 146 (1965)
255. NEALE, M.G. and D.V. PARKE:
Effects of pregnancy on the metabolism of drugs in the rat and rabbit.
Biochem. Pharmacol. 22, 1451 (1973)
256. NEUBERT, D.:
Beeinflussung des Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsels durch Pharmaka.
Der Internist 7, 435 (1966)
257. NIERHAUS, K. und J. WEBER:
Struktur u. Funktion der Ribosomen. p. 133 ff in: *Forschung '73*,
Berichte aus Wissenschaft und Technik.
Frankfurt: Fischer 1972

258. NORRED, W.P. and A.E. WADE:
Dietary fatty acid-induced alterations of hepatic microsomal drug metabolism.
Biochem. Pharmacol. 21, 2887 (1972)
259. NORRED, W.P. and A.E. WADE:
Effect of dietary lipid ingestion on the induction of drug-metabolizing enzymes by phenobarbital.
Biochem. Pharmacol. 22, 432 (1973)
260. NOVI, A.M., A. BLACKBURN, J. WOO, and R. BASERGA:
Increase in chromatin template activity induced by cycloheximide.
Lab. Invest. 29, 714 (1973)
261. NOVICK, W.J., C.M. STOHLER, and J. SWAGZDIS:
The influence of steroids on drug metabolism in the mouse.
J. Pharmacol. exp. Ther. 151, 139 (1966)
262. OBRIG, T.G., W.J. CULP, W.L. MC KEEHAN, and B. HARDESTY:
The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes.
J. Biol. Chem. 246, 174 (1971)
263. OMURA, T., R. SATO, D.Y. COOPER, O. ROSENTHAL, and R.W. ESTABROOK:
Function of cytochrome P-450 of microsomes.
Fed. Proc. 24, 1181 (1965)
264. OMURA, T., P. SIEKEVITZ, and G.E. PALADE:
Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes.
J. biol. Chem. 242, 2389 (1967)
265. ORRENIUS, S., J.L.E. ERICSSON, and L. ERNSTER:
Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes.
J. Cell Biol. 25, 627 (1965)
266. ORRENIUS, S. and L. ERNSTER:
Interaction between liver microsomes and compounds capable of undergoing enzymic hydroxylation.
Life Sci. 6, 1473 (1967)
267. ORTEGA, P.:
Light and electron microscopy of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) poisoning in the rat liver.
Lab. Invest. 15, 657 (1966)
268. OSTERTAG, W. and W. KERSTER:
The action of proflavine and actinomycin D in causing chromatid breakage in human cells.
Exp. Cell Res. 39, 296 (1966)

269. PARTHIER, B.:
Antibiotica, molekularbiologische Wirkungsmechanismen.
Nova Acta Leopoldina 34/188, 47 pp.
Hrsg. K. MOTHES,
Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1969
270. PATEL, J.M. and S.S. PAWAR:
Activities of phenobarbital induced liver microsomal
enzymes in rats fed protein- and fat-free diets.
Indian J. Biochem. biophys. 9, 277 (1972)
271. PELLERIN, J., A. D'LORIO, and E. ROBILIARD:
Influence des hormones sexuelles et l'hépatectomie
partielle sur l'anesthésie au pentobarbital.
Rev. Canad. Biol. 13, 257 (1954)
272. PETROVIC, J. and D.T. KANAZIR:
The effect of x-irradiation on the basal and substrate
induced level of tryptophan oxygenase and the biosynthesis
of nucleic acid in the liver of chicken embryos.
Strahlentherapie 143, 454 (1972)
273. PHILLIPS, B.M., T.A. MIYA, and G.K.W. YIM:
Studies on the mechanism of meprobamate tolerance in
the rat.
J. Pharmacol. exp. Ther. 135, 223 (1962)
274. PIERUCCI, O.:
Early effects of radiation on the biosynthesis of deoxy-
ribonucleic acid.
Radiat. Res. 32, 760 (1967)
275. POE, C.F., J.F. SUCHY, and N.F. WITT:
Toxicity of strychnine for male and female rats of
different ages.
J. Pharmacol. exp. Ther. 58, 239 (1936)
276. QUINN, G.P., J. AXELROD, and B.B. BRODIE:
Species and sex differences in metabolism and duration
of action of hexobarbital (Evipan).
Fed. Proc. 13, 396 (1954)
277. QUINN, G.P., J. AXELROD, and B.B. BRODIE:
Species, strain and sex differences in metabolism of
hexobarbitone, amidopyrine, antipyrine and aniline.
Biochem. Pharmacol. 1, 152 (1958)
278. RAJALAKSHMI, S., H. LIANG, D.S.R. SARMA, R. KISILEVSKY,
and E. FARBER:
Cycloheximide, an inhibitor of peptide chain formation
or release in liver in vivo and in vitro.
Biochem. biophys. Res. Commun. 42, 259 (1971)
279. RAUEN, H.M., H. KERSTEN und W. KERSTEN:
Zur Wirkungsweise von Actinomycinen.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 321, 139 (1960)

280. REICH, E.:
Binding to DNA and inhibition of DNA functions by actinomycin. p. 266 ff. in: Biochemical studies of antimicrobial drugs. 16th symposium, society for general microbiology. Cambridge: Univ. Press 1966
281. REICH, E. and I.G. GOLDBERG:
Progress in nucleic acid research and molecular biology. p. 183 ff. in: DAVIDSON J.N. and E.W. COHN (eds.): Actinomycin and nucleic acid function. New York: Academic 1964
282. REMMER, H.:
Die Beschleunigung des Evipanabbaues unter der Wirkung von Barbituraten.
Naturwissenschaften 45, 189 (1958)
283. REMMER, H.:
Die Wirkung der Nebennierenrinde auf den Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen.
Naturwissenschaften 45, 522 (1958)
284. REMMER, H.:
Die Verstärkung der Abbaugeschwindigkeit von Evipan durch Glykocorticoide.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 233, 184 (1958)
285. REMMER, H.: Die Beschleunigung von enzymatischen Oxidationen in den Lebermikrosomen unter dem Einfluss von Barbituraten.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 236, 7 (1959)
286. REMMER, H.:
Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluss von Luminal.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 235, 279 (1959)
287. REMMER, H.:
Hemmung und Steigerung mikrosomaler Oxydationen durch körpereigene und körperfremde Stoffe. Symp. über Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen.
Dtsch. Gesellsch. f. Physiol. Chemie u. Österr. Biochem. Gesellsch., Wien, Sept. 1962 (S.75)
288. REMMER, H.:
Drugs as activators of drug enzymes.
Proceed. I. intern. pharmacol. meeting, 1962, VI, 235
289. REMMER, H.:
Drug tolerance. p. 276 ff. in: CIBA found. symp: Enzymes and drug action.
London: Churchill 1962

290. REMMER, H.:
Die Ursache der Gewöhnung an oxydable Barbiturate.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 244, 311 (1963)
291. REMMER, H.:
The fate of drugs in the organism.
Ann. Rev. Pharmacol. 5, 405 (1965)
292. REMMER, H.:
Induction of microsomal hydroxylase. Involvement of a second factor besides cytochrome P-450.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 1621 (1968)
293. REMMER, H.:
The induction of hydroxylating enzymes by drugs.
p. 125 ff. in: FEBS symposium, XVI 1969
- 294a. REMMER, H.:
Induction of drug metabolizing enzymes in different animal species.
p. 14 ff. in: BAKER, S.B.C., J. TRIPOLD, and J. JACOB (eds.):
The problems of species difference and statistics in toxicology.
Amst., N.Y., London: Exc. Med. Found. 1970
- 294b. REMMER, H.:
The role of liver in drug metabolism.
Amer. J. Med. 49, 617 (1970)
295. REMMER, H.:
Enzyme induction phenomenon: Effects in vertebrate livers.
Proc. 2nd IUPAC intern. congr. of pesticide chemistry,
Tel Aviv, Febr. 1971
296. REMMER, H.:
The influence of anaesthetics on drug metabolizing enzymes.
Rapport de XXI congrès d'anesthésie-reanimation, Marseille, 1971
297. REMMER, H.:
Induction of drug metabolizing enzyme system in the liver.
Europ.J.clin. Pharmacol. 5, 116 (1972)
298. REMMER, H.:
The induction of the enzymic "detoxication" system in liver cells.
Rev. Can. Biol. 31, 193 (1972)
299. REMMER, H. und B. ALSLEBEN:
Die Aktivierung der Entgiftung in den Lebermikrosomen während der Gewöhnung.
Klin. Wschr. 36, 332 (1958)

300. REMMER, H., R.W. ESTABROOK, J. SCHENKMAN, and H. GREIM:
Reaction of drugs with microsomal liver hydroxylase: its
influence on drug action.
Naumyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Path. 259, 98 (1968)
301. REMMER, H. und H.J. MERKER:
Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum
in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital.
Klin. Wschr. 41, 276 (1963)
302. REMMER, H. and H.J. MERKER:
Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum:
association with drug metabolizing enzymes.
Science 142, 1657 (1963)
303. REMMER, H. and H.J. MERKER:
Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic
reticulum and drug-metabolizing enzymes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 123, 79 (1965)
304. REMMER, H., J. SCHENKMAN, R.W. ESTABROOK, H. SASAME, J. GILLETTE,
S. NARASIMHULU, D.Y. COOPER, and O. ROSENTHAL:
Drug interactions with hepatic microsomal cytochrome.
Molec. Pharmacol. 2, 187 (1966)
305. REMMER, H. and E. SCHÜPPEL:
The influence of ethanol on drug metabolism.
p. 73 ff. in: POPHAM R.E. (ed.):
Alcohol and alcoholism
Toronto: Univ. Press 1969
306. REMMER, H., M. SIEGERT und K. KRAUSE:
Die Aktivierung des Arzneimittelabbaus durch Pharmaka.
Naumyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmakol. 241, 549 (1961)
307. REMMER, H., M. SIEGERT und H.J. MERKER:
Vermehrung arzneimittelabbauender Enzyme durch Tolbutamid.
Naumyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmakol. 249, 71 (1964)
308. RICHARDSON, H.L., A.R. STIER, and E. BORSOS-NACHTNEBEL:
Liver tumor inhibition and adrenal histologic responses in
rats to which 3'-methyl-4-dimethylamino azobenzene and
20-methylcholanthrene were simultaneously administered.
Cancer Res. 12, 356 (1952)
309. RIZZO, A.J. and T.E. WEBB:
Ribosome formation in rat liver: evidence for post-trans-
criptional control.
Biochim. biophys. Acta 195, 109 (1969)
310. ROBILLARD, E., A. D'LORIO, and J. PELLERIN:
Influences endocriniennes sur la désintoxication hépatique
du pentobarbital.
Un. méd. Can. 83, 853 (1954)

311. ROBINSON, D.S. and P.M. HARRIS:
Ethionine administration in the rat. 2. Effects on the incorporation of ^{32}P -orthophosphate and DL-(1- ^{14}C)-leucine into the phosphatides and proteins.
Biochem. J. 80, 361 (1961)
312. RÖMPF, H. und E. ÜHLEIN:
Römpps Chemie-Lexikon
Stuttgart: Franckh 1973
313. ROSSO, R., M.G. DONELLI, G. FRANCHI, and S. GARATTINI:
Impairment of drug metabolism in tumor-bearing animals.
Europ. J. Cancer 7, 565 (1971)
314. ROTH, J.:
Einige Aspekte zum Wirkungsmechanismus von Antimetaboliten und alkylierenden Zytostatica auf den Zellstoffwechsel.
Hippokrates 40, 657 (1969)
315. RUBIN, E., P. BACCHIN, H. GANG, and C.S. LIEBER:
Induction and inhibition of hepatic microsomal and mitochondrial enzymes by ethanol.
Lab. Invest. 22, 569 (1970)
316. RUBIN, E., F. HUTTNER, and C.S. LIEBER:
Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes.
Science 159, 1469 (1968)
317. RUBIN, A., T.R. TEPHLY, and G.J. MANNERING:
Kinetics of drug metabolism by hepatic microsomes.
Biochem. Pharmacol. 13, 1007 (1964)
318. RUDDON, R.W. and A.M. COHEN:
Alteration of enzyme activity in rat liver following the acute and chronic administration of nicotine.
Toxicol. appl. Pharmacol. 16, 613 (1970)
319. RUDDON, R.W. and J.M. JOHNSON:
The effect of nitrogen mustard on DNA template activity in purified DNA and RNA polymerase systems.
Molec. Pharmacol. 4, 258 (1968)
320. RUMKE, C.L. and J. NOORDHOEK:
The influence of lymestrenol on the rate of metabolism of phenobarbital, phenytoin and hexobarbital in mice.
Europ. J. Pharmacol. 6, 163 (1969)
321. SCHENKMAN, J.B., I. FREY, H. REMMER, and R.W. ESTABROOK:
Sex differences in drug metabolism by rat liver microsomes.
Molec. Pharmacol. 3, 516 (1967)

322. SCHENKMAN, J.B., H. REMMER, and R.W. ESTABROOK:
Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Molec. Pharmacol. 3, 113 (1967)
323. SCHLEDE, E.: (unpubl.)
zit. von: SCHLEDE 324
324. SCHLEDE, E.:
Varying effect of phenobarbital on hepatic drug metabolism in rats of different ages.
Naumyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 282, 311 (1974)
325. SCHLEDE, E. and R. BOROWSKI:
Decreased effect of phenobarbital treatment on microsomal drug metabolizing enzyme activity during gestation.
Naumyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281, 341 (1974)
326. SCHLEDE, E. and H.J. MERKER:
Effect of benzo () pyrene treatment on the benzo () pyrene hydroxylase activity in maternal liver, placenta, and fetus of the rat during day 13 to day 18 of gestation.
Naumyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 272, 89 (1972)
327. SCHMÄHL, D.:
Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren.
Aulendorf: Cantor 1970
328. SCHMID, K., F. CORNU, P. IMHOF und H. KEBERLE:
Die biochemische Deutung der Gewöhnung an Schlafmittel.
Schweiz. med. Wschr. 94, 235 (1964)
329. SCHOENE, B., R. FLEISCHMANN, H.F. OLDERSHAUSEN und H. REMMER: (unpubl.)
zit. von: REMMER 297
330. SCHOLES, G.:
The radiation chemistry of aqueous solutions of nucleic acids and nucleoproteins.
Progr. biophys. Chem. 13, 59 (1963)
331. SCHWARZLOSE, W. und M. SÄBEL:
Der Einfluss von Actinomycin auf die Leber vorbestrahlter weisser Mäuse.
Strahlentherapie 139, 96 (1970)
- 332a. SEIFERT, J. and H. REMMER:
Suppression of synthesis of RNA present in microsomal membranes after administration of phenobarbital.
Biochem. Pharmacol. 20, 553 (1971)

- 332b. SEIFERT, J., J. VACHA, and H. REMMER:
Phenobarbital and liver growth. A biochemical study.
p. 253 ff. in: BAKER S.B.C. (ed.):
The correlation of adverse effects in man with observations
in animals.
Amsterdam: Exc. Med. Found. 1971
333. SELYE, H.:
Pharmaco-chemical interrelations among catatotoxic steroids.
Rev. Canad. Biol. 29, 49 (1970)
334. SELYE, H.:
Hormones and resistance.
J. pharm. Sci. 60, 1 (1971)
335. SELYE, H.:
Hormones and resistance.
Berlin: Springer 1971
336. SHAFRITZ, D.A. and W.F. ANDERSON:
Factor dependent binding of methionyl-tRNAs to reticulocyte
ribosomes.
Nature 227, 918 (1970)
337. SHEFER, S., S. HAUSER, and E.H. MOSBACH:
Stimulation of cholesterol 7 α -hydroxylase by phenobarbital
in two strains of rats.
J. Lipid Res. 13, 69 (1972)
338. SHULL, K.H., J. MC CONOMY, M. VOGT, A. CASTILLO, and E. FARBER:
On the mechanism of induction of hepatic adenosin triphosphate
deficiency by ϵ thionine.
J. biol. Chem. 241, 5060 (1966)
339. SHUSTER, L. and H. JICK:
The turnover of microsomal protein in the livers of pheno-
barbital-treated mice.
J. biol. Chem. 241, 5361 (1966)
340. SHYSH, A. and A.A. NOUJAIM:
Effects of 950 R whole-body gamma irradiation on some hepatic
drug metabolizing systems in mice.
Can. J. Pharm. Sci. 5, 46 (1970)
341. SHYSH, A. and A.A. NOUJAIM:
Effects of various doses of whole-body gamma irradiation on
hepatic nitroreductase in mice.
Can. J. Pharm. Sci. 6, 73 (1971)
342. SIEGERT, M. und H. REMMER:
Kumulation und Elimination von Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 243, 479 (1962)

343. SISLER, H.D. and M.R. SIEGEL:
Cycloheximide and other glutarimide antibiotics.
p. 283 ff. in: GOTTLIEB D. and P.S. SHAW (eds.):
Antibiotics
New York: Springer 1967
344. SLADEK, N.E. and G.J. MANNERING:
Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from
methylcholanthrene treated rats.
Biochem.biophys. Res. Commun., 24, 668 (1966)
345. SLADEK, N.E. and G.J. MANNERING:
Induction of drug metabolism. I. Differences in the
mechanisms by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital
produce their inductive effects on microsomal N-demethylating
systems.
Molec. Pharmacol. 5, 174 (1969)
346. SLADEK, N.E. and G.J. MANNERING:
Induction of drug metabolism. II. Qualitative differences in
the microsomal N-demethylating systems stimulated by polycyclic
hydrocarbons and by phenobarbital.
Molec. Pharmacol. 5, 186 (1969)
347. SMITH, R.L. and R.T. WILLIAMS:
Implications of the conjugation of drugs and other exogenous
compounds.
p. 457 ff. in: DUTTON G.J. (ed.):
Glucuronic acid
New York: Academic Press 1966
348. SMITH, S.J., R.N. HILL, R.A. GLEESON, and E.S. VESELL:
Evidence for post-transcriptional stabilization of ribosomal
precursor ribonucleic acid by phenobarbital.
Molec. Pharmacol. 8, 691 (1972)
349. SMUCKLER, E.A., O.A. ISERI, and E.P. BENDITT:
An intracellular defect in protein synthesis induced by
carbon tetrachloride.
J. exp. Med. 116, 55 (1962)
350. SMULSON, M.E. and J. THOMAS:
Ribonucleic acid biosynthesis of human cells during amino
acid deprivation.
J. biol. Chem. 244, 5309 (1969)
351. SOLIMOSS, B., J. WERRINGLOER, and S. TOTH:
The influence of pregnenolone-16 α -carbonitrile on hepatic
mixed-function oxygenases.
Steroids 17, 427 (1971)

352. SOLYMOS, B., H.G. CLASSEN, and S. VARGA:
Increased hepatic microsomal activity induced by
spironolactone and other steroids.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 132, 940 (1969)
353. STÄUBLI, W., R. HESS, and E.R. WEIBEL:
Correlated morphometric and biochemical studies on the
liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes.
J. Cell Biol. 42, 92 (1969)
354. STEKOL, J.A.:
Biochemical basis for ethionine effects on tissues.
Adv. Enzymol. 25, 369 (1963)
355. STOCK, K. und E. WESTERMANN:
Untersuchungen über den Mechanismus der narkoseverkürzenden
Wirkung von Monoaminoxydase-Hemmstoffen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 243, 44 (1962)
356. STRAMENTINOLI, G. und H. REMMER: (unpubl.)
zit. von: REMMER 297
357. STREFFER, C.:
Strahlen - Biochemie
Berlin: Springer 1969
358. STREFFER, C. and S. SCHAFFERNS:
The induction of liver enzymes by cortisol after combined
treatment of mice with x-irradiation and inhibitors of
protein biosynthesis.
Int. J. Radiat. Biol. 20, 301 (1971)
359. STRIPP, B., M. HAMRICK, and N. ZAMPAGLIONE:
Effect of spironolactone treatment of rats on the oxidation
of drugs by liver microsomes.
Fed. Proc. 29, 346 (1970)
360. TEMPEL, K.:
Fermentaktivierung unter dem Einfluß von ionisierenden
Strahlen und Radiomimetika am Beispiel der Desoxyribonuclease II.
Berlin, Hamburg: Parey 1968
361. TEMPEL, K.:
Zur Wirkung von Ganzkörper-Röntgenbestrahlung und 2,4,6-
Triäthylenimino-1,3,5-triazin auf die Niere der Maus:
Induktion einer Desoxyribonuclease I.
Zbl. Vet. Med. A. 20, 487 (1973)

382. VESELL, E.S., C.M. LANG, W.J. WHITE, G.T. PASSANANTI, and S.L. TRIPP:
Hepatic drug metabolism in rats: impairment in a dirty environment.
Science 179, 896 (1973)
383. VILLA-TREVINO, S., E. FARBER, T. STAEHELIN, F.O. WEITSTEIN, and H. NOLL:
Breakdown and reassembly of rat liver ergosomes after administration of ethionine or puromycin.
J. biol. Chem. 239, 3826 (1964)
384. VILLA-TREVINO, S., K.H. SHULLAND, and E. FARBER:
The role of adenosine triphosphate deficiency in ethionine-induced inhibition of protein synthesis.
J. biol. Chem. 238, 1757 (1963)
385. WAKSMAN, S.A. and H.B. WOODRUFF:
Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by a soil actinomycetes.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 609 (1940)
386. WARING, M.J.:
Cross-linking and intercalation in nucleic acids.
p. 235 ff. in 16th symposium, Soc. for general Microbiology. Cambridge: Univ. Press 1966
387. WARING, M.J.:
Drugs which affect the structure and function of DNA.
Nature 219, 1320 (1968)
388. WATTENBERG, L.W. and J.L. LEONG:
Effects of phenothiazines on protective systems against polycyclic hydrocarbons.
Cancer Res. 25, 365 (1965)
389. WETHERBY, J.H.:
Chronic toxicity of ammonia fumes by inhalation.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 300 (1952)
390. WELCH, R.M., B. GOMMI, A. ALVARES, and A.H. CONNEY:
Effect of enzyme induction on the metabolism of benzo (α) pyrene and 3'-methyl-4-monomethylaminoazo-benzene in the pregnant and fetal rat.
Cancer Res. 32, 973 (1972)
391. WELCH, R.M., S. HABER, B.W. GOMMI, C. ATKINS, and R.A. SALVADOR:
Effect of clofibrate and 1-methyl-4-piperidyl, bis(p-chlorophenoxy) acetate (Sandoz 42-348) on the metabolism of steroids and drugs by rat liver.
Fed. Proc. 29, 683 (1970)

392. WENZEL, D.G. and L.L. BROADIE:
Stimulatory effect of nicotine on the metabolism of meprobamate.
Toxicol. appl. Pharmacol. 8, 455 (1966)
393. WERRINGLOER, J.:
Stimulation of hepatic microsomal drug metabolism by pregnenolone-16 α -carbonitrile and phenobarbital.
zit. von: REMMER 297
394. WETTSTEIN, F.O., H. NOLL, and S. PENMAN:
Effect of cycloheximide on ribosomal aggregates engaged in protein synthesis in vitro.
Biochim. biophys. Acta 87, 525 (1964)
395. WILLIAMS, R.T.:
Detoxication mechanisms.
London: Chapman & Hall 1959
396. WILLIAMS, R.T.:
The metabolic pathways of exogenous substances.
p. 215 ff. in: ROE F.J.C. (ed.):
Metabolic aspects of food safety.
Oxford, Edinburgh: Blackwell 1970
397. WILLIAMS, R.T.:
Species variations in drug biotransformations.
p. 189 ff. in: LA DU, B.N., H.G. MANDEL, and E.L. WAY (eds.):
Fundamentals of drug metabolism and drug disposition.
Baltimore: Williams & Wilkins 1971
398. WILLIAMSON, A.R. and R. SCHWEET:
Role of the genetic message in polyribosome function.
J. molec. Biol. 11, 358 (1965)
399. WINTER, C.A. and L. FLATAKER:
Cage design as a factor influencing acute toxicity of respiratory depressant drugs in rats.
Toxicol. appl. Pharmacol. 4, 650 (1962)
400. WINTON, F.R.:
The rat-poisoning substance in red squills.
J. Pharmacol. exp. Ther. 31, 123 (1927)
401. WOLD, J.S. and W.J. STEELE:
Alteration in liver nuclear ribonucleic acid of rats treated with phenobarbital.
Molec. Pharmacol. 8, 681 (1972)

402. YATVIN, M.B., C. LAMAR jun., and H.C. PITOT:
The effect of gamma radiation and actinomycin on cortisone
induction of liver enzymes.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 139, 1220 (1972)
403. YAMAMOTO, I., K. NAGAI, H. KIMURA, and K. IWATSUBO:
Nicotine and some carcinogenes in special reference
to the hepatic drug-metabolizing enzymes.
Jap. J. Pharmacol. 16, 183 (1966)
404. YUKAWA, O. and T. NAKAZAWA:
Damages in the microsomal drug metabolizing enzyme system
after partial x-irradiation of rat liver.
Radiat. Res. 58, 101 (1974)

Herrn Prof. Dr. K. Tempel danke ich für die Überlassung des Themas und die immer gewährte väterliche Beratung. Ihm und Herrn Dr. R. Hollatz gilt auch mein Dank für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Michael Erber	geb. am 13. Januar 1944 in Stade
Eltern	Georg Erber, Bankbeamter Liselotte Erber, geb. Starcke
Familie	verheiratet seit 1968 mit der Bildhauerin Eva Erber, geb. Krauter Tochter Judith, geb. 1970
Grundschule	1950 bis 1954, Herrnschule, München
Höhere Schule	1954 Übertritt ins Wilhelms-Gymnasium, München
Reifeprüfung	1966 im Wittelsbacher-Gymnasium, München
Hochschule	Universität München
Studium	Wi-Se 1966/67 Naturwissenschaften ab So-Se 1967 Tiermedizin April 1972 Staatsexamen
Approbation	Mai 1972
berufliche Tätigkeit	seit September 1974 Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, München.

